



# Analyse fonctionnelle de nouvelles mutations pathogènes du canal chlorure CLC-KB impliquées dans le syndrome de Bartter

Mathilde Keck

## ► To cite this version:

Mathilde Keck. Analyse fonctionnelle de nouvelles mutations pathogènes du canal chlorure CLC-KB impliquées dans le syndrome de Bartter. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PA066222 . tel-00831597

**HAL Id: tel-00831597**

**<https://theses.hal.science/tel-00831597>**

Submitted on 7 Jun 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité: Physiologie et Physiopathologie

Présentée par :

M<sup>elle</sup> Mathilde KECK

**Analyse fonctionnelle de nouvelles mutations pathogènes du canal chlorure CLC-KB impliquées dans le syndrome de Bartter.**

Soutenue le 20 Septembre 2012

Devant le jury :

Pr Jean-Claude DUSSAULE

Président du jury

Dr Maria-Christina ZENNARO

Rapporteur

Dr Jacques BARHANIN

Rapporteur

Dr Rosa VARGAS-POUSSOU

Examineur

Dr Laurent BECK

Examineur

Pr Jacques TEULON

Directeur de thèse

## REMERCIEMENTS

Dans un premier temps, je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je remercie, plus particulièrement, mon encadrant, Jacques Teulon, qui a su m'encourager dans mes recherches et me laisser la liberté nécessaire à l'accomplissement de mes travaux, tout en étant toujours disponible et en y gardant un œil critique et avisé.

Je remercie Stéphane Lourdel et Marc Paulais pour leur écoute, leur gentillesse et les précieux conseils qu'ils m'ont offerts ces trois années.

Je remercie Alain Doucet pour son encadrement chaleureux et ma rapide insertion au sein de son équipe.

Je remercie Olga Andrini, Sébastien L'Hoste et Teddy Grand pour leur aide et les bons moments passés au laboratoire.

Je remercie également Silke Härteis, Olivier Lahuna, Rosa Vargas-Poussou, Anne Blanchard, Laurent Beck, Christoph Korbmacher et Francisco Sepulveda pour les échanges que nous avons eus et qui m'ont grandement aidée à faire avancer ce projet de thèse.

Je remercie l'ensemble des membres du laboratoire, tout particulièrement Anie Azroyan, Gaëlle Brideau, Lydie Cheval, Nadia Defontaine, Virgile Donhyo, Dalila Haker, Suresh Krishna Ramakrishnan et Amel Salhi, pour leur gentillesse et tous nos moments de rigolades.

Enfin je remercie ma famille et mes amis qui ont été présents et m'ont soutenue tout au long de ces trois années.

# SOMMAIRE

INTRODUCTION .....	9
<b>1. Les canaux et transporteurs de la famille des CLC.....</b>	<b>9</b>
1.1. Famille des CLC .....	9
1.2. Structure et propriétés biophysiques .....	10
a) Structure .....	10
b) Division de la famille en canaux et transporteurs .....	13
c) Gating et régulation du gating des CLC.....	14
1.3. Fonctions physiologiques des CLC et leur implication pathologique .....	16
<b>2. Vues actuelles sur les propriétés et fonctions du canal chlorure CLC-KB.....</b>	<b>22</b>
2.1. Clonage du CLC-KB et de la barttine .....	22
2.2. Propriétés du CLC-KB .....	23
2.3. Localisations et fonctions du CLC-KB .....	28
a) Localisation rénale du CLC-KB et transports au sein du néphron distal.....	28
b) Fonctions rénales du CLC-KB .....	34
c) Localisation dans l'oreille interne du CLC-KB.....	38
d) Fonction de maintien du potentiel endocochléaire nécessaire à l'audition .....	38
<b>3. Le syndrome de Bartter .....</b>	<b>40</b>
3.1. Phénotypes et traitements .....	40
3.2. Données génétiques .....	42
3.3. Apports des modèles animaux.....	45
3.4. Physiopathologie du syndrome de Bartter de type III .....	48
<b>4. Objectifs du travail de thèse .....</b>	<b>52</b>
MÉTHODES .....	53
<b>1. Biologie moléculaire .....</b>	<b>53</b>
1.1. ADNc et vecteurs d'expression .....	53
1.2. Mutagenèse dirigée .....	54
1.3. Transformation des bactéries compétentes .....	54
1.4. Purification des plasmides .....	54
1.5. Transcription <i>in-vitro</i> .....	54
<b>2. Méthodes liées à l'expression hétérologue au sein d'ovocytes de <i>Xenopus laevis</i>....</b>	<b>55</b>
2.1. Injection .....	55
2.2. Voltage-clamp en double microélectrodes .....	56
2.3. Luminescence .....	58
<b>3. Méthodes liées à l'expression hétérologue au sein des lignées rénales HEK293 et MDCK.....</b>	<b>59</b>
3.1. Culture et transfection .....	59
3.2. Enregistrements en cellule entière (HEK293) .....	59
3.3. Immunofluorescence (MDCK) .....	60

<b>4. Statistiques .....</b>	<b>61</b>
<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>62</b>
<b>1. Première publication: <i>CLCNKB</i> mutations causing Bartter-Gitelman syndrome affect channel surface expression.....</b>	<b>62</b>
1.1. Résumé .....	62
1.2. Article .....	64
<b>2. Seconde publication: Reduced surface expression and blunted pH-dependent gating of ClC-Kb chloride channel in mild Bartter syndrome caused by <i>CLCNKB</i> mutation within the selectivity filter .....</b>	<b>87</b>
2.1. Résumé .....	87
2.2. Article .....	90
<b>3. Résultats complémentaires .....</b>	<b>123</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>126</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>141</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>144</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : famille des CLC .....	10
Figure 2 : structure en dimère des CLC .....	11
Figure 3 : structure d'un monomère de CLC eucaryote.....	13
Figure 4 : modèle du « gating glutamate » de ecCLC-1 .....	15
Figure 5 : structure de la barttine .....	23
Figure 6 : exemple de courants enregistrés et de courbe courant-voltage pour le complexe CLC-KB/Barttine.....	24
Figure 7 : régulation des conductances du CLC-KA et du CLC-KB par le pH et le $\text{Ca}^{2+}$ extracellulaires .....	26
Figure 8 : coupe longitudinale d'un rein humain et néphron en vue détaillée .....	28
Figure 9 : schéma d'un néphron.....	29
Figure 10 : schéma de la réabsorption de NaCl au sein de la branche fine et de la branche large ascendantes de l'anse de Henle.....	31
Figure 11 : schéma de la réabsorption de NaCl au sein des parties initiale et terminale du tubule contourné distal.....	32
Figure 12 : schéma de la réabsorption de NaCl au sein des cellules principales, des cellules intercalaires $\alpha$ et des cellules intercalaires $\beta$ du tubule connecteur et du canal collecteur...	34
Figure 13 : schéma des différents transporteurs au sein d'une cellule marginale de la strie vasculaire.....	38
Figure 14 : schéma des différentes protéines impliquées dans le syndrome de Bartter au sein de la branche large ascendante de l'anse de Henle et dans le syndrome de Gitelman au sein du tubule contourné distal.....	43

Figure 15 : cartes des plasmides pTLN contenant CLC-KB FLAG et pVitro2 contenant CLC-KB et Barttine.....	53
Figure 16 : schéma du dispositif de voltage-clamp en double microélectrodes .....	57
Figure 17 : principe général de la luminescence.....	58
Figure 18 : configuration appelée « enregistrement en cellule entière » .....	60
Figure 19 : courbes courant-voltage enregistrées à partir d'ovocytes baignés dans une solution de ND96 à 20mM de $\text{Ca}^{2+}$ pH7,4 .....	123
Figure 20 : conductances à +60mV normalisées calculées à partir d'enregistrements d'ovocytes baignés dans une solution de ND96 à 20mM de $\text{Ca}^{2+}$ pH7,4 .....	124
Figure 21 : inhibition relative de la conductance à +60mV en fonction du pH externe .....	125
Figure 22 : localisation au niveau d'un monomère CLC-KB des mutations pathogènes analysées dans les deux publications présentées et les résultats complémentaires.....	126
Figure 23 : localisation de la valine 170, des sérines 218 et 232 et de l'histidine 497 sur un modèle 3D du CLC-KB réalisé à partir de la structure d'ecCLC-1 .....	131
Figure 24 : localisation de la valine 170, des sérines 218 et 232, du glutamate 261 et de l'aspartate 278 sur un modèle 3D du CLC-KB réalisé à partir de la structure d'ecCLC-1.....	131
Figure 25 : western-blot réalisé à partir d'extraits protéiques totaux des CLC-KB WT, R92W, V170M, R351P, R438H et L439P transfectés dans des cellules HEK293T.....	136
Figure 26 : sites de glycosylation hypothétiques du CLC-KB localisés sur le monomère .....	137
Figure 27 : cellules MDCK électroporées avec le complexe CLC-KB sauvage/Barttine ou le complexe CLC-KB muté L439P/Barttine présentant un triple marquage dapi (bleu), biotine (rouge) et FLAG (vert).....	138

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : résumé des principales caractéristiques des CLC de mammifère .....	21
Tableau 2 : caractéristiques différenciant les syndromes de Bartter et de Gitelman .....	42
Tableau 3 : différentes mutations du gène <i>CLCNKB</i> rapportées dans la littérature.....	51
Tableau 4 : composition des différentes solutions .....	61



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

**9-AC** : 9-anthracenecarboxylic acid  
**ADN** : Acide Désoxyribonucléique  
**ADNc** : Acide Désoxyribonucléique complémentaire  
**ADP** : Adénosine Diphosphate  
**AMP** : Adénosine Monophosphate  
**AQP2** : Aquaporine 2  
**ARN** : Acide Ribonucléique  
**ARNm** : Acide Ribonucléique messenger  
**ATP** : Adénosine Triphosphate  
**BSA** : Bovin Serum Albumin  
**CBS** : Cystathionine- $\beta$ -synthase  
**CFTR** : Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator  
**CLC** : Chloride Channel  
**CPP** : 2-(p-chlorophenoxy)propionic acid  
**DAPI** : 4',6'-diamidino-2-phénylindole  
**DPC** : 2-(phenylamino)benzoic acid  
**DIDS** : 4,4'-diisothiocyanato-2,2'-stilbenedisulfonic acid disodium salt  
**ECL** : Enhanced Chemiluminescence  
**EGFP** : Enhanced Green Fluorescent Protein  
**EGTA** : Acide éthylèneglycol tétraacétique  
**ENaC** : Epithelial Na Channel  
**Endo H** : Endoglycosidase H  
**HA** : Hémagglutinine  
**HEK** : Human Embryonic Kidney  
**HRP** : Horseradish Peroxydase  
**kb** : kilobase  
**kDa** : kilodalton  
**kg** : kilogramme  
**KO** : Knock-Out  
**mmHg** : millimètre de mercure  
**Nedd4-2** : Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-2  
**NFA** : Niflumic acid

**NHE3** : Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger isoform 3

**NPPB** : 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid

**OSR1** : Oxidative stress-responsive kinase-1

**Ostm1** : Osteopetrosis associated transmembrane protein 1

**pb** : paire de base

**PBS** : Phosphate Buffer Saline

**PGE2** : Prostaglandine E2

**PNGase F** : Peptide-N4-(N-acetyl-beta-D-glucosaminy)asparagine amidase F

**PKA** : Protéine Kinase A

**PKC** : Protéine Kinase C

**PMA** : Phorbol-12-Myristate-13-Acetate

**pS**: Pico Siemens

**RT-PCR** : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

**SGK1/3** : Serum and Glucocorticoid inducible Kinase 1/3

**SITS** : 4-acetamido-4'-isothiocyanato-2,2'-stilbenedisulfonic acid disodium salt

**SPAK** : STE20/SPS1-related proline/alanine-rich kinase

**SV40** : Simian vacuolating Virus 40

**WNK** : With No-lysine Kinase

**WT** : Wild Type

# INTRODUCTION

## 1. Les canaux et transporteurs de la famille des CLC

Dans les domaines de la biophysique et de la physiologie des membranes, l'étude des canaux chlorure a souvent été relayée au second plan. En effet, pendant plus de 50 ans, l'étude des canaux ioniques a été dominée par celle des fonctions neuronales telles que la génération des potentiels d'action, la propagation des signaux le long des axones et dendrites ou encore la formation des ondes électriques. La signalisation électrique au sein des neurones utilise majoritairement les cations  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{H}^+$ . Les canaux chlorure étaient donc traditionnellement considérés comme des protéines exerçant des fonctions discrètes dans la majorité des tissus. Cependant, l'étude des canaux de type  $\text{GABA}_A$  au sein du système nerveux, de la conductance chlorure au sein du muscle squelettique représentant 80% de la conductance membranaire totale et permettant le contrôle de l'excitabilité musculaire, le clonage du CFTR (Riordan et al. 1989) et enfin l'étude du transport de chlorure au sein des épithéliums ont permis de mettre en lumière le rôle fondamental des canaux chlorure. Parmi eux, nous trouvons ceux appartenant à la famille des CLC.

### 1.1. Famille des CLC

L'étude de l'organe électrique de la raie torpille, *Torpedo marmorata*, en 1990 permis le clonage par expression hétérologue dans l'ovocyte de xénope du membre fondateur de cette famille de canaux et transporteurs de chlorure, le CLC-0 (Jentsch et al. 1990). Il s'agit de la plus grande famille de transporteurs anioniques connue (Jentsch 2008). Les CLC s'expriment au sein de tous les phylums, des bactéries aux humains, deux isoformes ayant été identifiées chez la bactérie *Escherichia coli*, une chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, au moins 3 chez les plantes et animaux dont 9 chez les mammifères (Jentsch 2008). Tous les CLC étaient considérés, à l'origine, comme des canaux chlorure, mais il a été récemment démontré que plusieurs d'entre eux fonctionnent comme des échangeurs chlorure/proton (Accardi et al. 2004 ; Picollo et al. 2005 ; Scheel et al. 2005). La stoechiométrie de

l'échangeur de la bactérie *Escherichia coli*, ecCLC-1, est connue : elle est de deux chlorure pour un proton (Accardi et al. 2004).

Chez les mammifères, la famille des CLC se compose de 9 protéines classées, sur la base de leur homologie, en 3 sous-familles. La première regroupe des canaux chlorure exprimés à la membrane plasmique (CLC-1, CLC-2, CLC-KA et CLC-KB), tandis que les deux autres sont des échangeurs électrogéniques chlorure/proton majoritairement exprimés au niveau des endosomes et lysosomes (CLC-3 à CLC-7). CLC-3, CLC-4 et CLC-5 possèdent 80% d'homologie, tandis que CLC-6 et CLC-7 partagent 45% d'homologie de séquence protéique (Jentsch 2008) [voir Figure 1]. Certains CLC nécessitent la présence d'une sous-unité régulatrice pour être fonctionnels. C'est le cas du canal CLC-2 qui sollicite GlialCAM, des canaux CLC-K qui ont besoin de la barttine et de l'échangeur CLC-7 qui requiert ostm1 (Jeworutzki et al. 2012 ; Estévez et al. 2001 ; Lange et al. 2006).

Le clonage des gènes des CLC a permis l'étude détaillée de leur structure, de leurs propriétés biophysiques et de leur fonction auxquelles nous allons nous intéresser dès à présent.

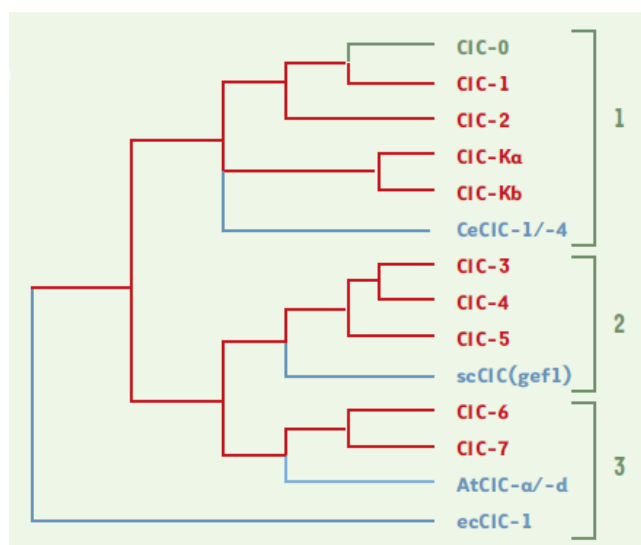


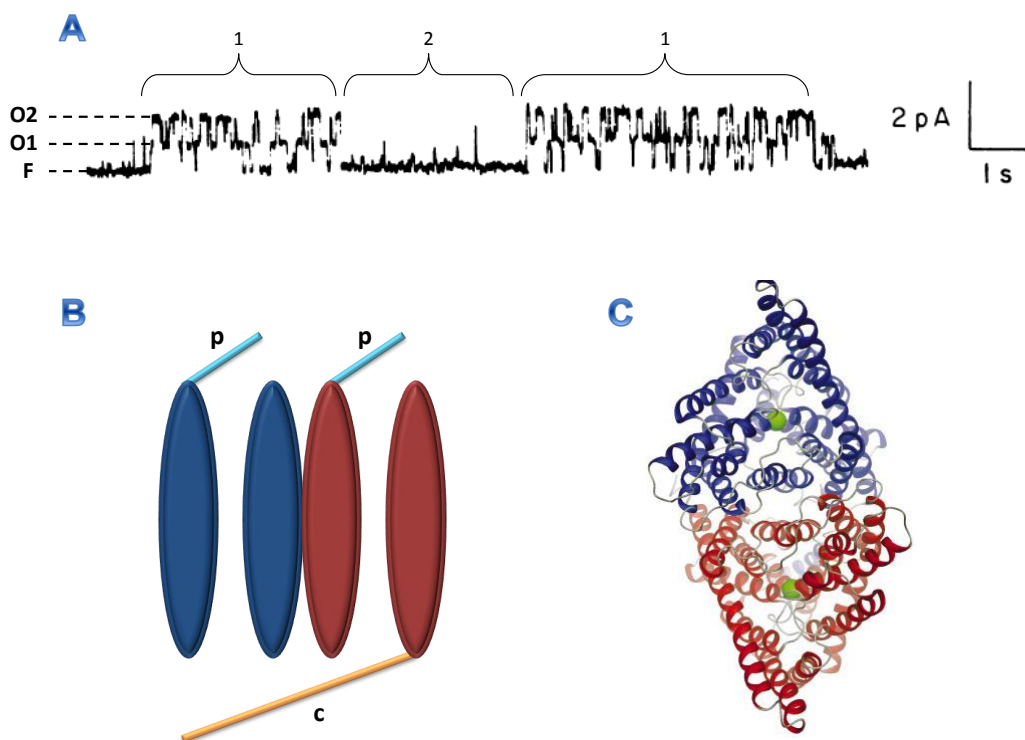
Figure 1 : famille des CLC. Sont représentés en rouge les 9 CLC décrits chez l'Homme, en vert le canal de l'organe électrique de la raie torpille, et en bleu les CLC de différents organismes: *Caenorhabditis elegans* (Ce), *Saccharomyces cerevisiae* (sc), *Arabidopsis thaliana* (At) et *Escherichia coli* (ec) (d'après Teulon et al. 2002).

## 1.2. Structure et propriétés biophysiques

### a) Structure

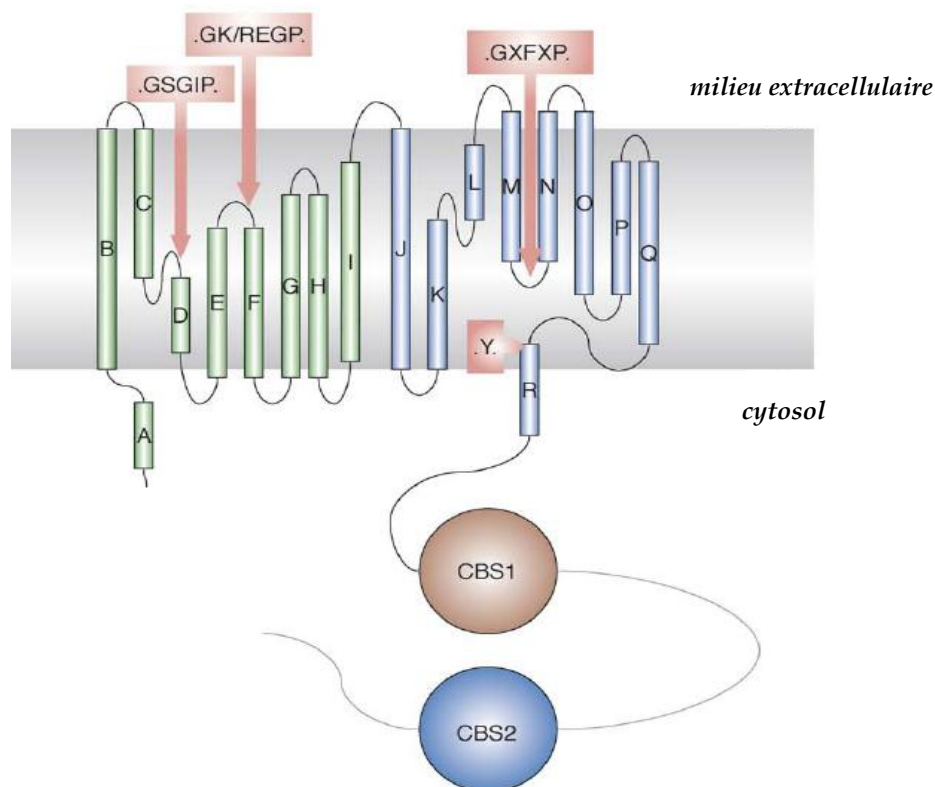
Dès 1984, avant même le clonage du CLC-0, Miller et al. ont réussi à purifier les canaux chlorure de la raie torpille et à étudier leur activité électrique en les insérant dans

des bicouches lipidiques (Miller et al. 1984). Ils ont observé des créneaux de courant organisés sur deux niveaux, de durée relativement brève, séparés par des fermetures plus longues durant lesquelles aucune activité n'est observée [voir Figure 2A]. Ils ont alors fait l'hypothèse que ces canaux fonctionnent en dimères, chaque monomère étant équipé d'un pore (appelé protopore) qui s'ouvre et se ferme rapidement de façon indépendante l'un de l'autre. Le dimère est contrôlé par une porte commune aux deux protopores et fonctionnant de façon plus lente [voir Figure 2B]. Cette hypothèse a reçu une confirmation éclatante à la suite des études de cristallographie réalisées au début des années 2000 sur stCLC (*Salmonella typhimurium*) et ecCLC-1 (*Escherichia coli*) (Dutzler et al. 2002) et récemment sur CmCLC (*Cyanidioschyzon merolae*) (Feng et al. 2010) [voir Figure 2C]. Certains hétérodimères, tel que CLC-0/CLC-1 ou encore CLC-0/CLC-2, sont fonctionnels (Weinreich et al. 2001).



**Figure 2 :** structure en dimère des CLC. **A:** Enregistrement caractéristique par patch-clamp en canal unitaire de CLC-0 où l'on observe un état de fermeture (F) et un sous-état de conductance (O1) dont l'amplitude est égale à la moitié de celle du niveau totalement ouvert (O2). On constate également des périodes pendant lesquels les ouvertures et les fermetures sont rapides (1) séparées par de longues fermetures (2) (d'après Miller et al. 1984). **B:** Schéma du fonctionnement des CLC. Chacun des deux protopores est commandé par une porte (p) responsable des ouvertures et fermeture rapides (1), tandis qu'une porte commune (c) est à l'origine des longues fermetures observées (2). **C:** Structure de stCLC déterminée par cristallographie (vue du dessus depuis l'espace extracellulaire). Les deux dimères sont représentés en bleu et en rouge, une sphère verte représente un ion chlorure au sein du filtre de sélectivité (d'après Dutzler et al. 2002).

La cristallographie a permis de comprendre la structure 3D des CLC. Chacun des monomères est formé de dix-huit hélices  $\alpha$  dont seize hélices transmembranaires, l'hélice A étant cytosolique et l'hélice R partiellement transmembranaire (Dutzler et al. 2002) [voir [Figure 3](#)]. Le monomère montre des motifs répétés: on considère qu'il est formé par l'assemblage anti-parallèle des hélices B à I (en vert sur la [Figure 3](#)) et J à Q (en violet sur la [Figure 3](#)). Contrairement à stCLC et ecCLC-1, les CLC d'eucaryotes et d'archées possèdent un long domaine cytoplasmique C-terminal pourvu de deux domaines CBS, pour cystathionine- $\beta$ -synthase une enzyme chez qui ces domaines ont été identifiés (Jentsch 2008) [voir [Figure 3](#)]. Ces domaines, généralement en tandem, sont présents dans de nombreuses classes de protéines d'archées, de procaryotes et d'eucaryotes (Ignoul et al. 2005). Leur rôle n'est pas vraiment déterminé. Certaines données impliquent les domaines CBS dans le trafic intracellulaire des CLC. Par exemple, 3 mutants non-sens du CLC-5, tronquant le domaine CBS2, sont incapables d'atteindre les endosomes et sont retenus dans le Golgi (Carr et al. 2003). Cependant, il faut garder en mémoire qu'un défaut de trafic intracellulaire ne résulte pas nécessairement d'une perte d'un signal de sortie mais peut être secondaire à une malformation de la protéine qui est alors retenue par le système de contrôle de qualité de la cellule. D'autres données suggèrent un rôle des domaines CBS dans le contrôle de l'activité (« gating »). Par exemple, Estévez et al. ont identifié des mutations ponctuelles spécifiques au sein du CBS2 qui modifient le gating de la porte commune de CLC-0 et CLC-1. En particulier, la mutation du glutamate 763 de CLC-0 abolit le gating de la porte commune sans interférer avec le gating des protopores (Estévez et al. 2004). Une dernière hypothèse serait que les domaines CBS fonctionnent comme des capteurs métaboliques en liant l'ATP, l'ADP ou l'AMP intracellulaire, les mutations pathologiques de CLC-2 G715E et G826D invalidant la liaison CLC-2/ATP (Scott et al. 2004). Chez CLC-1, ATP, ADP et AMP modifient la voltage-dépendance de la porte commune mais pas celle des protopores. Des mutations dans les domaines CBS du CLC-1 éliminent cet effet suggérant que ces métabolites exercent leur effet en se liant à ces domaines (Bennetts et al. 2005). De plus, chez CLC-5, la liaison de ces nucléotides sur les domaines CBS entraîne une potentialisation des courants (Zifarelli et al. 2009).



**Figure 3 :** structure d'un monomère de CLC eucaryote (d'après Dutzler 2006). Les CLC possèdent 18 hélices  $\alpha$  (indiqués par les lettres A à R) ainsi qu'un long domaine cytoplasmique C-terminal pourvu de deux domaines CBS. Les hélices vertes (A à I) et bleues (J à R) constituent des motifs antiparallèles. Les acides aminés encadrés en rose sont, quant à eux, impliqués dans le filtre de sélectivité anionique et peut-être également dans le gating.

La cristallographie a également révélé l'existence de plusieurs sites de liaison anioniques, trois pour chaque protopore, pouvant être occupés simultanément avec une constante de liaison pour le chlorure comprise entre 4 et 40mM (Lobet et al. 2006).

### **b) Division de la famille en canaux et transporteurs**

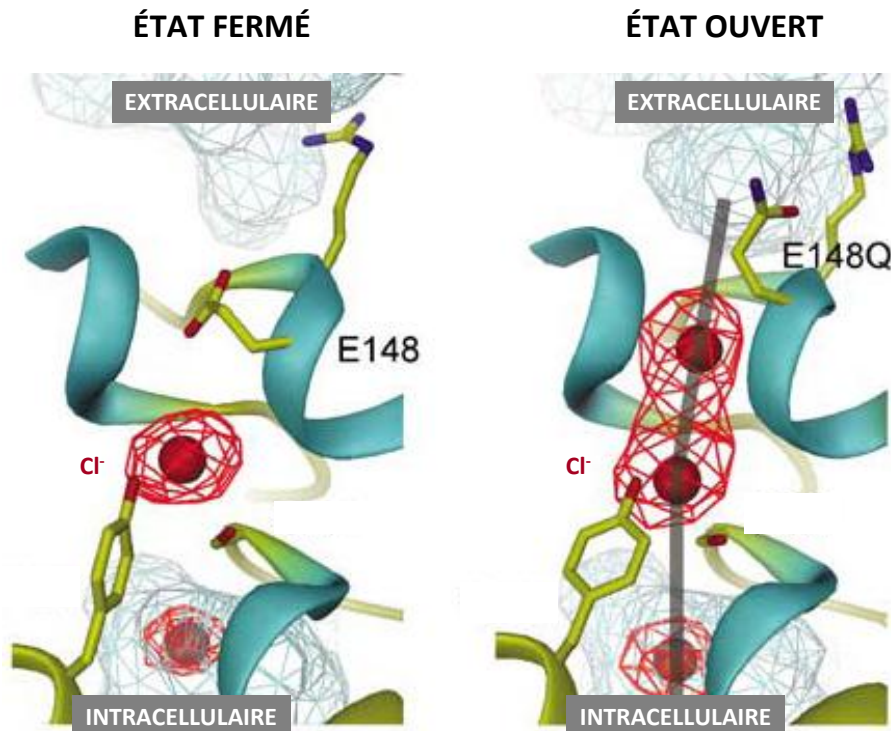
À l'origine, les CLC étaient tous considérées comme des canaux chlorures. ecCLC-1 a fait l'objet d'études électrophysiologiques approfondies après purification et incorporation dans des bicouches lipidiques (Accardi et al. 2004). De cette manière, les auteurs ont pu mesurer les courants en contrôlant précisément les concentrations ioniques de part et d'autre de la bicouche. Ils ont également travaillé avec des liposomes dans lesquels ils ont inclus ecCLC-1. Cette approche expérimentale leur a permis de mesurer directement les variations de pH et de concentration en chlorure, à l'aide de sondes fluorescentes, de part et d'autre de la membrane des liposomes. Ces expériences ont démontré de manière définitive

que ecCLC-1 se comporte comme un échangeur  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  dont la stoechiométrie est de deux ions chlorure pour un proton. D'autres études ont, par la suite, démontré que les CLC-3 à CLC-7 fonctionnent également comme des échangeurs  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  (Matsuda et al. 2010 ; Picollo et al. 2005 ; Scheel et al. 2005 ; Neagoe et al. 2010 ; Graves al. 2008). Chez tous ces échangeurs  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ , on retrouve la présence d'un glutamate identifié à la fin de l'hélice  $\alpha$  H en position 203 chez ecCLC-1 (Accardi et al. 2005), 281 chez CLC-4, 268 chez CLC-5 (Zdebik et al. 2008) et 267 chez CLC-6 (Neagoe et al. 2010) qui, lorsqu'il est neutralisé, abolit tous les courants des échangeurs  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  mais pas leur adressage (Accardi et al. 2005 ; Zdebik et al. 2008 ; Neagoe et al. 2010). Ce glutamate, dénommé « proton glutamate », est absent des canaux chlorures CLC-1, CLC-2 et CLC-K où il est remplacé par une valine.

### c) Gating et régulation des CLC

Les CLC, à l'exception des CLC-K (Estévez et al. 2001 ; Waldegger et al. 2002), sont voltage-dépendants. La voltage-dépendance n'est pas due à la présence, comme pour les canaux cationiques voltage-dépendants, d'un senseur de voltage intrinsèque de la protéine (Noda et al. 1984), mais est due à la fixation du chlorure sur ses sites à l'intérieur du protopore (Pusch 1996 ; Pusch 2004) et à la présence d'un autre glutamate, situé au sein de l'hélice  $\alpha$  F, dans le protopore : le « gating glutamate ». En effet, si l'on neutralise le glutamate en position 148 chez ecCLC-1 (Accardi et al. 2004), 224 chez CLC-3 et CLC-4, 211 chez CLC-5 (Li et al. 2002 ; Matsuda et al. 2010 ; Picollo et al. 2005 ; Scheel et al. 2005) et 200 chez CLC-6 (Neagoe et al. 2010) on transforme les échangeurs  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  en simples canaux chlorure dont la conductance n'est plus voltage-dépendante. Le « gating glutamate » est présent chez tous les CLC, à l'exception des deux CLC-K où il est remplacé par une valine. Selon le modèle établi par le Dr Zdebik pour CLC-5, les protons vont se fixer au niveau du « proton glutamate », ce qui va alors faire pivoter la chaîne latérale du « gating glutamate » et ainsi ouvrir le pore (<http://www.ucl.ac.uk/npp/research/azdebik>). C'est pourquoi la neutralisation du « proton glutamate » entraîne une absence de courant car les protons ne pouvant plus se lier à celui-ci, la chaîne latérale du « gating glutamate » ne pivote plus et donc obstrue le pore. La neutralisation du « gating glutamate » entraîne, quant à elle, une ouverture constitutive du pore expliquant la forte conductance chlorure observée, tandis que les protons ne peuvent plus être transportés car, tout comme le « proton glutamate », le « gating glutamate » constitue un site de liaison pour les protons [voir Figure 4].





**Figure 4 :** modèle du « gating glutamate » de ecCLC-1 (d'après Lobet et al. 2006). Le pore est bloqué par la charge négative de la chaîne du glutamate 148 (à gauche). La neutralisation de ce glutamate (E148Q) entraîne l'ouverture du pore (à droite). Les ions chlorure et la protonation du glutamate peuvent également déplacer la chaîne du glutamate.

Concernant les canaux chlorure CLC-0, CLC-1 et CLC-2, le gating voltage-dépendant des protopores produit également un déplacement de la chaîne latérale du « gating glutamate », négativement chargée, qui entre alors en compétition avec les ions chlorure pour un site commun de liaison, ce qui explique donc la forte dépendance au chlorure du gating des CLC. De plus, CLC-0 et CLC-1 voient leur activité augmenter lorsque le pH externe s'acidifie (Rychkov et al. 1996). Il est alors probable que ce « gating glutamate » soit responsable du gating pH-dépendant car, une fois protoné, il entraînerait l'ouverture des canaux. Ainsi la présence d'une valine chez les CLC-K à la place du « gating glutamate » pourrait expliquer que leur voltage-dépendance ne soit pas distinctement visible et qu'ils soient activés par une alcalinisation du pH externe, et non une acidification (Estévez et al. 2001 ; Waldegger et al. 2002).

Bien que les portes des protopores soient indépendantes l'une de l'autre, la porte commune et celles des protopores sont interdépendantes. En effet, la porte commune est davantage ouverte si les deux portes des protopores sont ouvertes et inversement la porte commune est davantage fermée si l'une ou les deux portes des protopores sont fermées (Richard et al. 1990).

### 1.3. Fonctions physiologiques des CLC et leur implication pathologique

Les fonctions physiologiques des CLC ont été largement déduites des phénotypes des souris KO et des pathologies humaines découvertes. Des mutations chez 5 gènes CLC entraînent des maladies héréditaires humaines (CLC-1, CLC-2, CLC-KB, CLC-5 et CLC-7) et il existe des souris invalidées pour 8 des 9 gènes CLC (seules les souris KO CLC-K2, l'orthologue murin du CLC-KB, n'existent pas).

Le canal chlorure CLC-1 est le plus tissu-spécifique des CLC car il s'exprime de façon presque exclusive au niveau de la membrane plasmique des cellules du muscle squelettique (Steinmeyer et al. 1991). Lorsqu'il est exprimé de manière hétérologue dans l'ovocyte de xénope ou des cellules de mammifère, CLC-1 induit un courant rectifiant entrant, de conductance unitaire d'environ 1-2pS, régulé par les anions intra et extracellulaires, mais également par le pH intra et extracellulaire (Pusch et al. 1994 ; Weinreich et al. 2001). Il est ouvert au potentiel de repos du muscle squelettique et est activé par une dépolarisation (Jentsch 2008). De plus, contrairement au CLC-0 de *Torpedo marmorata*, la porte commune et celles des protopores sont toutes trois ouvertes par dépolarisation (Jentsch 2008). Le gating dépend non seulement du voltage, du chlorure et du pH (Rychkov et al. 1996) mais également de la concentration intracellulaire en ATP (Bennetts et al. 2005). Les patients et animaux perdant la fonction du CLC-1 présentent des myotonies se traduisant par des contractions musculaires involontaires. En effet, CLC-1 est essentiel au contrôle de l'excitabilité du muscle squelettique car il permet la repolarisation après un potentiel d'action et la stabilisation du potentiel membranaire au niveau du muscle squelettique. Une perte de CLC-1 entraînera donc une hyperexcitabilité musculaire. Le CLC-1 a tout d'abord été muté chez des souris (Steinmeyer et al. 1991), puis des mutations ont été découvertes chez des patients atteints de myotonie (Koch et al. 1992). Les myotonies humaines sont des maladies héréditaires récessives (type Becker) ou dominantes (type Thomsen). À l'heure actuelle, environ 30 mutations pathogènes du gène *CLCN1* ont été décrites chez l'homme.

Le CLC-2 est un canal chlorure largement exprimé dans tout l'organisme (cœur, cerveau, pancréas, poumon, foie...) (Thiemann et al. 1992) dont le rôle est encore discuté. Sa conductance unitaire est d'environ 3pS (Weinreich et al. 2001) ; il est activé par le gonflement cellulaire, l'hyperpolarisation et le pH extracellulaire légèrement acide (Jentsch 2008). Aucune maladie humaine ne lui est aujourd'hui associée. Un rôle dans la survenue de

l'épilepsie (Haug et al. 2003) lui a été attribué mais est cependant très controversé : une étude a montré récemment qu'il n'existait pas de relation directe entre l'apparition de l'épilepsie et des mutations au sein du gène *CLCN2* (Blanz et al. 2007). En outre, les résultats obtenus par les auteurs de la première publication (Haug et al. 2003) n'ont pas pu être reproduits par la suite (Niemeyer et al. 2004). Les souris KO CLC-2 suggèrent, quant à elles, une fonction dans l'homéostasie ionique du testicule et de la rétine (Bösl et al. 2001). Récemment, il a été montré que CLC-2 fonctionne avec une sous-unité protéique, GlialCAM (Jeworutzki et al. 2012).

Les fonctions physiologiques et les propriétés des CLC-K et de leur sous-unité régulatrice la barttine, qui s'expriment au sein du rein et de l'oreille interne, seront traités plus en aval au sein de cette introduction (cf. Partie 2 : Vues actuelles sur les fonctions et propriétés du canal chlorure CLC-KB).

Lorsqu'il est exprimé dans des systèmes d'expression hétérologue, le CLC-3 est retrouvé majoritairement au niveau des endosomes et lysosomes. Le CLC-3 atteint les endosomes en étant transitoirement adressé à la membrane plasmique d'où il est rapidement endocyté via un mécanisme d'interaction d'un motif dileucine N-terminal avec la clathrine (Zhao et al. 2007). Cependant, plusieurs groupes n'ont pas réussi à enregistrer de courants CLC-3 significatifs dans divers systèmes d'expression hétérologue (par exemple, Friedrich et al. 1999). En revanche, les travaux de Weinman et al. ont mis en évidence un courant CLC-3 possédant une rectification sortante importante et une séquence de conductance  $\text{Cl}^- > \text{I}^-$  (Li et al. 2000), très semblables à celles observées pour le CLC-4 ou CLC-5 (Friedrich et al. 1999). Ceci n'est pas très surprenant puisque le CLC-3 partage 80% d'homologie de séquence avec ces derniers. Récemment, il a été montré que CLC-3 fonctionnait comme un échangeur  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  (Matsuda et al. 2010). L'hypothèse que CLC-3 est un canal régulé par le volume s'exprimant à la membrane plasmique (Duan et al. 1997) n'a pas été confirmée par l'analyse des souris KO CLC-3. CLC-3 aurait plus vraisemblablement une fonction d'acidification des endosomes, par neutralisation des charges de la  $\text{H}^+$ -ATPase de type V, nécessaire à l'intégrité de l'hippocampe et de la rétine (Stobrawa et al. 2001). Cependant, plus de travaux sont nécessaires pour comprendre les multiples rôles de cette protéine vésiculaire.

L'échangeur CLC-4 appartient à la même branche d'homologie que CLC-3 et CLC-5 et est exprimé dans de nombreux tissus incluant le cerveau, le muscle squelettique, le foie et

les reins (Jentsch et al. 1995 ; Van Slegtenhorst et al. 1994). Il est majoritairement localisé au niveau des membranes intracellulaires mais atteint la membrane plasmique à un certain degré lors d'expression hétérologue dans les ovocytes de xénope et des cellules de mammifère. Les courants CLC-4 sont fortement rectifiants sortants et ressemblent à ceux du CLC-5 (Friedrich et al. 1999). La localisation subcellulaire du CLC-4 reste controversée, probablement du fait des problèmes de spécificité des anticorps, et ses fonctions physiologiques restent encore à élucider, les souris KO CLC-4 ne montrant aucun phénotype (Jentsch 2008).

CLC-5 a une distribution tissulaire plus réduite que celle de CLC-3 et CLC-4 car il est majoritairement exprimé au niveau des épithéliums rénal et intestinal (Steinmeyer et al. 1995 ; Vandewalle et al. 2001). Au niveau du rein, il s'exprime au niveau de tubule proximal et des cellules intercalaires du canal collecteur où il colocalise avec la  $H^+$ -ATPase de type V au niveau des endosomes (Günther et al. 1998 ; Sakamoto et al. 1999). La localisation endosomale du CLC-5 a été confirmée par de nombreux groupes, tant au niveau du rein qu'au niveau de l'intestin. Une expression suffisante à la membrane plasmique de systèmes d'expression hétérologue a permis une analyse biophysique des transports ioniques du CLC-5. Il s'agit d'un échangeur  $Cl^-/H^+$  (Picollo et al. 2005 ; Scheel et al. 2005) montrant des courants fortement rectifiants sortants (Friedrich et al. 1999). Les mutations du gène codant le CLC-5 conduisent à la maladie de Dent (Fischer et al. 1994), nom donné en hommage au médecin anglais qui, le premier, a décrit ce syndrome en 1964 (Dent et al. 1964). C'est une maladie rénale héréditaire liée à l'X caractérisée par une protéinurie de bas poids moléculaire, une calciurie et des calculs rénaux. En raison de son mode de transmission, la maladie de Dent affecte essentiellement les hommes. Depuis l'identification du gène *CLCN5* dans la maladie de Dent, plus de 40 mutations de ce gène ont été identifiées (Jentsch 2008). Les résultats issus des études sur les deux modèles de souris KO CLC-5 reproduisent la protéinurie humaine et révèlent une endocytose défectueuse au niveau du tubule proximal indiquant un rôle essentiel du CLC-5 dans la modulation du contenu en chlorure des endosomes précoces (Novarino et al. 2010). Les calculs rénaux pourraient être la conséquence indirecte d'un défaut d'endocytose au niveau du tubule proximal. Responsable d'un métabolisme anormal de l'hormone parathyroïdienne et de la vitamine D, ce défaut d'endocytose entraînerait secondairement une internalisation du transporteur NaPi-2a rénal

et une augmentation de la réabsorption intestinale de calcium et de phosphate (Günther et al. 2003 ; Maritzen et al. 2006 ; Piwon et al. 2000 ; Wang et al. 2000).

Avec le CLC-7, CLC-6 représente la troisième branche des CLC de mammifère. Cet échangeur  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  (Neagoe et al. 2010) est exprimé dans de nombreux tissus incluant le cerveau, les reins et les testicules (Brandt et al. 1995). Le CLC-6 est majoritairement exprimé au niveau des endosomes tardifs (Poët et al. 2006). Les souris KO CLC-6 ne présentent pas de phénotype apparent (Poët et al. 2006). Une analyse plus approfondie de ces souris révèle un défaut de stockage lysosomal au niveau des segments initiaux des axones neuronaux, CLC-6 étant hautement exprimé au niveau du ganglion rachidien. Le défaut de stockage lysosomal au niveau de ces neurones sensoriels chez les souris KO explique alors leur sensibilité à la douleur réduite (Poët et al. 2006). La pathologie des souris KO CLC-6 ressemble cliniquement aux formes légères de céréïdes-lipofuscinoses neuronales. Deux mutations faux-sens de CLC-6, absentes de 200 contrôles, ont été identifiées chez une cohorte de 75 patients. Cependant, ces variants, présents à l'état hétérozygote, n'ont pas permis de prouver le rôle causal du CLC-6 dans cette maladie (Poët et al. 2006).

Le CLC-7 a été cloné par homologie au CLC-6 avec lequel il partage 45% d'identité d'acide aminé (Brandt et al. 1995). Aucun courant n'a pu être détecté dans les ovocytes de xénope ou des cellules de mammifère (Brandt et al. 1995) avant la découverte d'Ostm1, la sous-unité régulatrice de CLC-7 (Leisle et al. 2011). Récemment, à travers des mesures électrophysiologiques dans des bicouches lipidiques, le groupe de Graves a démontré que CLC-7 est un échangeur  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  et qu'il est impliqué dans l'acidification des lysosomes (Graves al. 2008). Ce transporteur s'exprime dans de nombreux tissus (Brandt et al. 1995) et semble localisé au niveau des endosomes tardifs et des lysosomes (Kornak et al. 2001). La fonction physiologique du CLC-7 a été découverte grâce à l'étude des souris KO qui présentent une ostéopétrose en lien avec la forte expression de CLC-7 au niveau de la membrane plissée des ostéoclastes où il participe donc à la neutralisation des charges générées par la  $\text{H}^+$ -ATPase de type V permettant ainsi l'acidification des lacunes où s'effectuent la résorption osseuse, un rôle similaire à celui proposé pour les CLC-3 et CLC-5 (Kornak et al. 2001). Tous les éléments recueillis grâce à l'étude des souris KO CLC-7 ont permis de lier les ostéopétroses humaines récessive (Kornak et al. 2001) et dominante (Cleiren et al. 2001) à une perte de fonction de CLC-7 dans les ostéoclastes. À ce jour, plus de 30 mutations du gène *CLCN7* conduisant à une ostéopétrose ont été mises en évidence. Le CLC-7 fonctionne avec une sous-unité protéique,

Ostm1 (Lange et al. 2006). La perte d'Ostm1 mène également à une ostéopétrose car la stabilité de CLC-7 est compromise (Jentsch et al. 2008). Le phénomène par lequel CLC-7 perd sa stabilité en absence d'Ostm1 n'est pas connu. Cependant, CLC-7 est le seul CLC de mammifère à ne pas être glycosylé, ce qui est particulièrement surprenant, les protéines lysosomales étant normalement hautement glycosylées afin de les protéger de l'attaque des enzymes lysosomales. Ostm1, très glycosylée, pourrait alors protéger CLC-7 de la dégradation lysosomale (Lange et al. 2006).

Vingt-deux ans après leur identification moléculaire (Jentsch et al. 1990), les canaux et transporteurs de la famille des CLC sont toujours un passionnant thème de recherche en perpétuelle extension. La cristallisation des CLC bactériens et eucaryotes, la caractérisation d'échangeurs  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ , le déchiffrement des pathologies associées aux mutations de CLC et l'identification de sous-unité protéiques représentent des avancées majeures de ces années passées. Ces importantes découvertes amènent de nouveaux axes de recherches à explorer tels que la cristallisation des CLC mammaliens afin de comprendre les différences structurelles entre échangeurs et canaux ou encore l'exploration de la régulation des CLC par des protéines et des cascades de signalisation.

CLC	Nature	Sous-unité régulatrice	Expression tissulaire	Fonctions	Maladie humaine associée	Phénotype du modèle murin
CLC-1	Canal $\text{Cl}^-$		Muscle squelettique	Stabilisation du potentiel de membrane	Myotonie congénitale	Myotonie congénitale
CLC-2	Canal $\text{Cl}^-$	GlialCAM	Étendue	?	Épilepsie ?	Dégénération rétinienne et leucodystrophie testiculaire
CLC-KA	Canal $\text{Cl}^-$	Barttine	Reins et oreille interne	Transport transépithélial de $\text{Cl}^-$		Diabète insipide néphrologique
CLC-KB	Canal $\text{Cl}^-$	Barttine	Reins et oreille interne	Transport transépithélial de $\text{Cl}^-$	Syndrome de Bartter de type III	
CLC-3	Échangeur $\text{Cl}^-/\text{H}^+$		Étendue	Acidification des endosomes		Dégénération de l'hippocampe et de la rétine
CLC-4	Échangeur $\text{Cl}^-/\text{H}^+$		Étendue	?		Aucun
CLC-5	Échangeur $\text{Cl}^-/\text{H}^+$		Reins et intestin	Acidification des endosomes	Maladie de Dent	Protéinurie
CLC-6	Échangeur $\text{Cl}^-/\text{H}^+$		Étendue	Acidification des endosomes		Céroïdes-lipofuscinoses neuronales
CLC-7	Échangeur $\text{Cl}^-/\text{H}^+$	Ostm1	Étendue	Acidification des lacunes des ostéoclastes	Ostéopétrose	Ostéopétrose

Tableau 1 : résumé des principales caractéristiques des CLC de mammifère.

## 2. Vues actuelles sur les propriétés et fonctions du canal chlorure CLC-KB

Pour une meilleure compréhension de cette seconde partie, il est important de relever la nomenclature des deux canaux chlorures CLC-K : le CLC-KA et le CLC-KB correspondent aux CLC-K humains, tandis qu'ils sont respectivement nommés CLC-K1 et CLC-K2 chez les autres espèces. Les sigles rCLC-K et sCLC-K seront donc par la suite utilisés pour désigner les CLC-K de rat et de souris.

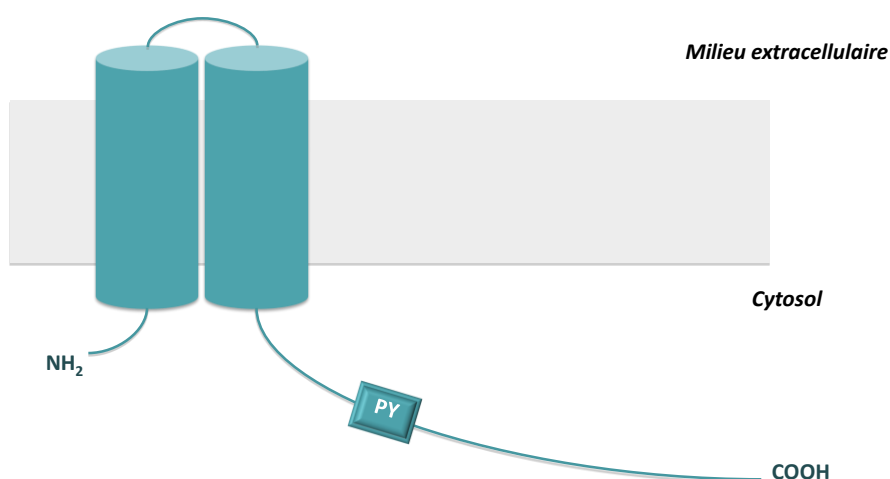
### 2.1. Clonage du CLC-KB et de la barttine

Ce n'est qu'il y a dix-neuf ans que l'on assiste au clonage du rCLC-K1 (Uchida et al. 1993). Il faudra encore attendre une année supplémentaire avant le clonage du rCLC-K2 (Adachi et al. 1994) et des deux CLC-K humains (Kieferle et al. 1994). Les CLC-K de rat et d'humain partagent environ 80% d'homologie de séquence (Kieferle et al. 1994). Les CLC-KA et CLC-KB montrent 94% et 91% d'identité en termes d'ARN et de protéine et sont situés sur le même chromosome (chromosome 1) où ils ne sont séparés que de 11kb d'ADN génomique (Kieferle et al. 1994). Il est donc probable que les gènes *CLCNKA* et *CLCNKB* résultent d'une duplication génique.

Seule l'expression dans l'ovocyte de xénope du rCLC-K1 génère des courants (Uchida et al. 1993), l'expression du rCLC-K2 et des deux CLC-K humains ne générant aucun courant (Kieferle et al. 1994). Il faudra attendre la découverte du gène de la barttine, *BSND*, en 2001 (Birkenhäger et al. 2001) pour exprimer fonctionnellement les CLC-K dans l'ovocyte de xénope et enregistrer leur activité électrique. Le gène *BSND* doit son nom au fait que ses mutations entraînent un syndrome de Bartter avec surdité (*BSND* pour Bartter Sndrome with Sensorineural Deafness). Lors de sa découverte, la communauté scientifique s'est demandée s'il s'agissait d'un régulateur de protéines de transport d'ions impliquées dans le syndrome de Bartter ou bien d'un nouveau transporteur ou canal. Cette protéine de 320 acides aminés, dont le gène est également localisé sur le chromosome 1, présente une structure totalement différente de celle des CLC (Estévez et al. 2001) [voir Figure 5]. Elle se compose d'un court domaine cytosolique N-terminal (8 acides aminés), de deux segments transmembranaires (46 acides aminés) et d'un long domaine cytosolique C-terminal (266 acides aminés) contenant un signal proline-tyrosine d'internalisation [voir Figure 5]. La



barttine augmente l'adressage membranaire de tous les CLC-K (Estévez et al. 2001 ; Hayama et al. 2003 ; Scholl et al. 2006 ; Waldegger et al. 2002). De plus, elle altère quelques propriétés biophysiques des courants CLC-K, telles que leur sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire (Waldegger et al. 2002) et le gating (Scholl et al. 2006 ; Fischer et al. 2010). La co-expression de la barttine avec le CLC-5 ou ROMK n'a pas d'effet sur les courants sauvages, la barttine semble donc spécifique des CLC-K (Waldegger et al. 2002). Il a été récemment proposé que la barttine se lie aux hélices B et J de chaque monomère CLC-K (Tajima et al. 2007), ce qui est en accord avec la cristallographie des CLC bactériens et eucaryotes car ces hélices, situées à la périphérie des monomères, sont accessibles pour la barttine. Cependant, cette conclusion doit être confirmée par d'autres approches expérimentales et la stoechiométrie reste encore à déterminer bien que les auteurs proposent une interaction de quatre barttines pour deux monomères CLC-K (Tajima et al. 2007).



**Figure 5 :** structure de la barttine. Elle se compose d'un court domaine cytosolique N-terminal, de deux segments transmembranaires et d'un long domaine cytosolique C-terminal contenant un motif proline-tyrosine (PY) d'internalisation.

## 2.2. Propriétés du CLC-KB

L'expression de CLC-KB en l'absence de barttine, aussi bien dans l'ovocyte de xénope que dans la lignée humaine rénale tsA201, ne produit aucun courant significativement différent du courant endogène (Estévez et al. 2001 ; Scholl et al. 2006 ; Waldegger et al. 2000 ; Waldegger et al. 2002). En présence de barttine, on observe des courants qui se

désactivent partiellement à des voltages négatifs et s'activent à des voltages positifs, donc une courbe courant-voltage modérément rectifiante sortante (Estévez et al. 2001 ; Waldegger et al. 2002) [voir Figure 6]. La séquence de conductance anionique du CLC-KB est la suivante :  $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- = \text{I}^-$  (Waldegger et al. 2002). Ces propriétés diffèrent des courants du complexe CLC-KA/Barttine qui s'activent à des voltages négatifs et se désactivent partiellement à des voltages positifs, montrant une courbe courant-voltage à peu près linéaire, et dont la séquence de conductance anionique est  $\text{Cl}^- = \text{Br}^- > \text{NO}_3^- = \text{I}^-$  (Waldegger et al. 2002).

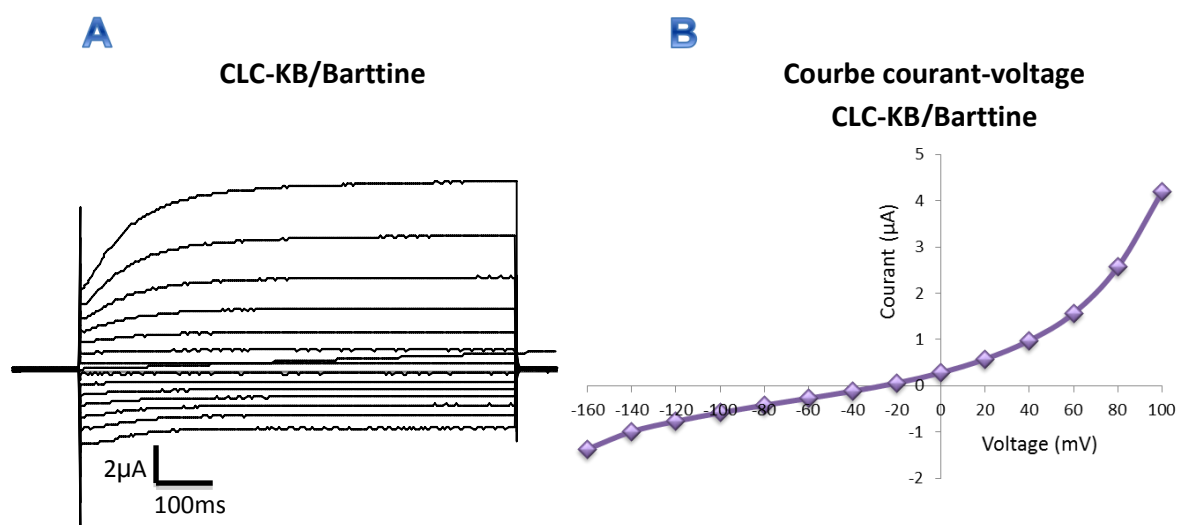


Figure 6 : exemple de courants enregistrés (A) et de courbe courant-voltage (B) pour le complexe CLC-KB/Barttine dans l'ovocyte de xénope réalisés au laboratoire.

En l'absence de barttine, le CLC-KB est majoritairement localisé au niveau du réticulum endoplasmique dans des systèmes d'expression hétérologue (Scholl et al. 2006). La co-expression de la barttine avec le CLC-KB augmente considérablement son adressage à la membrane plasmique (Scholl et al. 2006 ; Waldegger et al. 2002). Cependant, en absence de barttine, il y existe tout de même une expression, bien qu'environ trois fois plus faible que celle du rCLC-K1, significative de CLC-KB à la membrane plasmique (Scholl et al. 2006). De ce fait, l'inexistence de courants CLC-KB en absence de barttine signifie, soit qu'il y a trop peu de canaux pour enregistrer un courant, soit que le CLC-KB n'est pas fonctionnel sans barttine. La suite de cette étude semble indiquer que la seconde hypothèse serait la plus probable car différentes délétions de la barttine montrent que seuls la queue N-terminale et les deux domaines transmembranaires semblent nécessaires à la sortie du réticulum endoplasmique et l'export vers la membrane plasmique, tandis que les 17 premiers acides

aminés de la queue C-terminale semblent essentiels à la fonctionnalité du CLC-KB (Scholl et al. 2006). De plus, la queue C-terminale de la barttine ne semble pas se lier de façon stable au CLC-KB (Scholl et al. 2006).

Aucune étude n'a été menée concernant l'effet de la barttine sur le gating du CLC-KB. Cependant, des résultats décrits pour le rCLC-K1 et le CLC-KA montrent que la barttine ne modifie pas le gating rapide des protopores mais qu'elle entraîne une ouverture constitutive de la porte commune (Fischer et al. 2010).

Nous avons mentionné précédemment que le « gating glutamate » très conservé des CLC était remplacé par une valine chez les CLC-K. Or, plusieurs équipes ont montré, chez rCLC-K1, que la mutation de cette valine en glutamate ne modifiait pas le gating du rCLC-K1 mais uniquement sa voltage dépendance (Waldegger et al. 2000 ; Fischer et al. 2010). En effet, lorsqu'on remplace la valine en position 166 par un glutamate, la porte commune va alors s'ouvrir lors d'une hyperpolarisation (alors qu'elle s'ouvrait lors d'une dépolarisation chez le rCLC-K1 sauvage) et les portes des protopores vont s'ouvrir lors d'une dépolarisation (alors qu'elles s'ouvriraient lors d'une hyperpolarisation chez le rCLC-K1 sauvage). Cette étude démontre donc que le résidu 166 des CLC-K déterminerait uniquement la voltage-dépendance mais pas le gating des CLC-K.

Les courants des CLC-K sont amplifiés lors d'une augmentation du pH et de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaires (Estévez et al. 2001 ; Gradogna et al. 2010 ; Martinez et al. 2008 ; Uchida et al. 1995 ; Waldegger et al. 2002) [voir Figure 7]. La régulation des CLC-K par les protons externes diffère de celle du CLC-2 qui montre un site activateur lié au « gating glutamate » et un site inhibiteur (Niemeyer et al. 2009). Elle diffère également de celles du CLC-0 et du CLC-1 qui sont activés par un pH acide (Hanke et al. 1983 ; Rychkov et al. 1996). Les autres CLC sont tous pH-dépendant du fait du « gating glutamate », seuls les CLC-K présentent une valine à la place de ce glutamate signifiant que la pH-dépendance des CLC-K ne peut être médiée par le même mécanisme. Par contre, la sensibilité des CLC-K au  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire est unique parmi les CLC. Les résidus E261 et D278 semblent de bons candidats pour former le site de liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  (Gradogna et al. 2010). Le CLC-KB est plus sensible au pH externe mais moins sensible au  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire que le CLC-KA (Estévez et al. 2001 ; Gradogna et al. 2010) [voir Figure 7]. Le  $\text{Ca}^{2+}$  et le pH n'agissent pas en occluant directement le pore mais par modulation allostérique c'est-à-dire qu'ils induisent un changement de conformation du canal (Gradogna et al. 2010). Ils semblent agir via des

mécanismes et des sites de liaison indépendants (Gradogna et al. 2010). La modulation de l'activité des CLC-K pour des concentrations physiologiques de  $\text{Ca}^{2+}$  et de protons (entre 1,2 et 1,4mM et entre pH7,2 et pH7,6) a été proposée par Pusch (Gradogna et al. 2010) mais elle est discutable. Ces auteurs font l'hypothèse, pour justifier un éventuel rôle physiologique, que la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  et en protons de l'interstitium serait susceptible de varier de façon importante. De façon plus claire, on conçoit aisément qu'une altération de la régulation des CLC-K par le  $\text{Ca}^{2+}$  et les protons extracellulaires puisse avoir un impact dans un cadre pathologique.

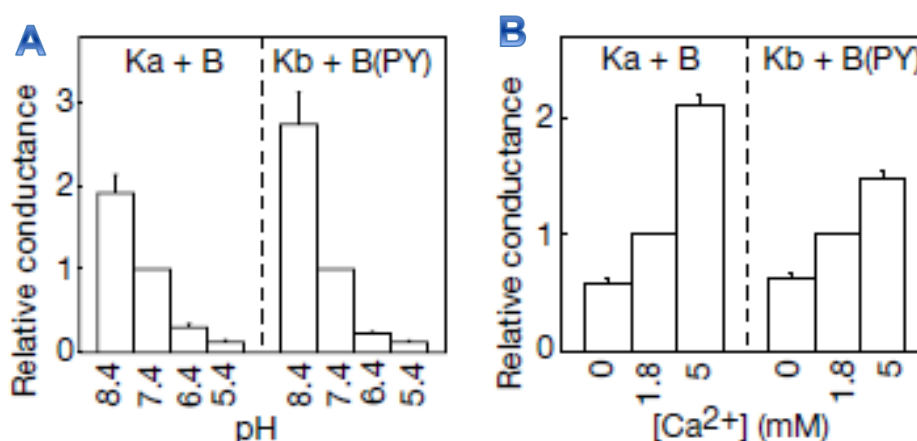


Figure 7 : régulation du CLC-KA et du CLC-KB par le pH (A) et le  $\text{Ca}^{2+}$  (B) extracellulaires (d'après Estévez et al. 2001). Le motif PY de la barttine a été muté afin de diminuer l'internalisation des complexes CLC-K/Barttine dépendante de l'ubiquitination.

L'étude des conductances unitaires des complexes rCLC-K1/Barttine et CLC-KA/Barttine montrent qu'elles sont de 33pS et 26pS. Ce sont les conductances unitaires des CLC les plus importantes décrites jusqu'à aujourd'hui (Fischer et al. 2010). Les conductances unitaires des complexes rCLC-K2/Barttine et CLC-KB/Barttine n'ont, quant à elles, pas été étudiées mais deux articles ont rapporté la présence de canaux chlorure natifs de 10pS à la membrane basolatérale du tubule contourné distal et des cellules intercalaires du canal collecteur de souris. Ces canaux montrent une séquence de perméabilité anionique et une dépendance au  $\text{Ca}^{2+}$  et au pH comparable à celles des complexes rCLC-K2(cloné)/Barttine et CLC-KB(cloné)/Barttine (Lourdel et al. 2003 ; Teulon et al. 2005 ; Nissant et al. 2006). Quelques propriétés, qui n'ont pas encore été étudiées chez le CLC-K2 et le CLC-KB clonés, ont pu être mises en évidence chez ces canaux chlorure natifs (Lourdel et al. 2003) : 1°) l'activité de ce canal est inhibée par le PMA (un activateur de la PKC) ; 2°) ce canal ne semble pas modulé par la voie de l'adénylate cyclase car ni la sous-unité catalytique de la PKA, ni la

forskoline (un activateur de l'adénylate cyclase) ne font varier son activité ; 3°) ce canal est insensible à la concentration intracellulaire en calcium ; 4°) ce canal est très sensible au pH intracellulaire (lorsqu'il augmente, le canal s'active).

L'activation et l'inhibition pharmacologique des CLC-K ont été étudiées en détail par mutagenèse et les sites de liaison cartographiés (Liantonio et al. 2002 ; Liantonio et al. 2004 ; Liantonio et al. 2006 ; Piccolo et al. 2004 ; Piccolo et al. 2007). Malgré que les CLC-KA et CLC-KB soient très proches en termes de séquence, certaines molécules sont environ 5 fois plus sélectives pour le CLC-KA (Piccolo et al. 2004). Plusieurs bloquants classiques des canaux chlorure ont été testés sur le CLC-KA et le CLC-KB (9-AC, CPP, DPC, NFA, NPPB, DIDS et SITS) (Liantonio et al. 2004). Or, seuls le 3-phenyl-CPP et le DIDS bloquent le CLC-KA ( $K_D \sim 80\text{-}90\mu\text{M}$ ), tandis que le CLC-KB est 5 à 6 fois moins sensible à ces 2 composés ( $K_D \sim 400\text{-}600\mu\text{M}$ ) (Piccolo et al. 2004). Le blocage par le 3-phenyl-CPP est réversible et compétitif avec le chlorure extracellulaire suggérant que le site de liaison du 3-phenyl-CPP est localisé dans le pore (Piccolo et al. 2004). Le blocage par le DIDS n'est pas immédiatement réversible car il faut rincer pendant un temps prolongé (Piccolo et al. 2004). La cristallographie des CLC bactériens a permis d'identifier deux acides aminés N68/D68 et G72/E72, respectivement chez CLC-KA et CLC-KB, qui sont responsables de la différence de sensibilité des deux CLC-K à ces composés (Piccolo et al. 2004). En effet, la mutation N68D de CLC-KA diminue sa sensibilité au 3-phenyl-CPP et au DIDS, alors, qu'inversement, la mutation D68N de CLC-KB augmente sa sensibilité à ces deux composés. La mutation G72E de CLC-KA diminue uniquement sa sensibilité au DIDS, tandis que la mutation E72G de CLC-KB augmente sa sensibilité au DIDS. Ces deux résidus sont situés du côté extracellulaire du pore, indiquant le probable site de liaison de ces composés (Piccolo et al. 2004). Le NFA semble, quant à lui, activer les courants CLC-KA et CLC-KB à des concentrations comprises entre 10 et 1000  $\mu\text{M}$  (Liantonio et al. 2006). Cependant, une dose importante de NFA (2mM) inhibe le CLC-KA, mais pas CLC-KB, ni les mutants CLC-KA N68D et CLC-KA G72E, indiquant que l'effet inhibiteur du NFA est transmis par un site de liaison différent de ceux du 3-phenyl-CPP et du DIDS (Liantonio et al. 2006 ; Piccolo et al. 2007). L'élaboration d'un modèle prédictif illustre que le CLC-KA posséderait deux sites de liaison pour le NFA : lorsqu'un seul des deux est occupé, le NFA augmente les courants CLC-KA, tandis que lorsque les deux sont occupés, le NFA bloque le canal (Piccolo et al. 2007). Les trois acides aminés, L155, G345 et A349, éliminent spécifiquement l'activation induite par le NFA sans altérer l'effet bloquant du NFA

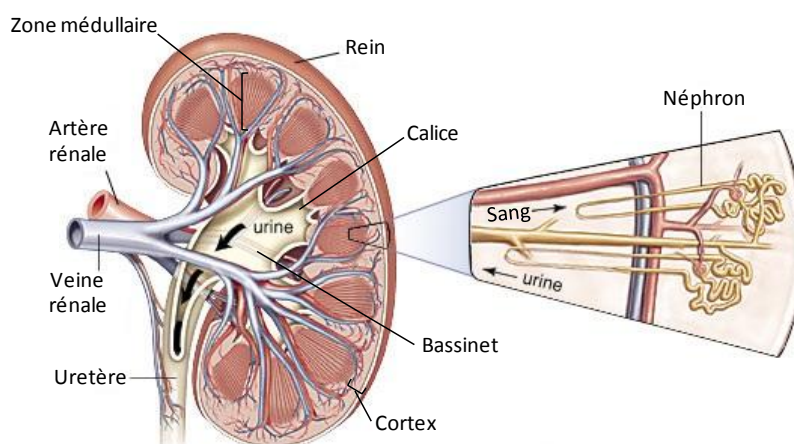
(Zifarelli et al. 2010). Ces acides aminés sont exposés au côté extracellulaire et sont, si l'on considère les dimensions moléculaires du NFA, suffisamment proches les uns des autres (Zifarelli et al. 2010). Il est donc possible que ces trois résidus constituent le site de liaison médiant l'activation par le NFA. Cependant, on ne peut pas exclure la possibilité que l'effet de ces mutations soit dû à une altération du changement de conformation qui suit la liaison du NFA.

### 2.3. Localisations et fonctions du CLC-KB

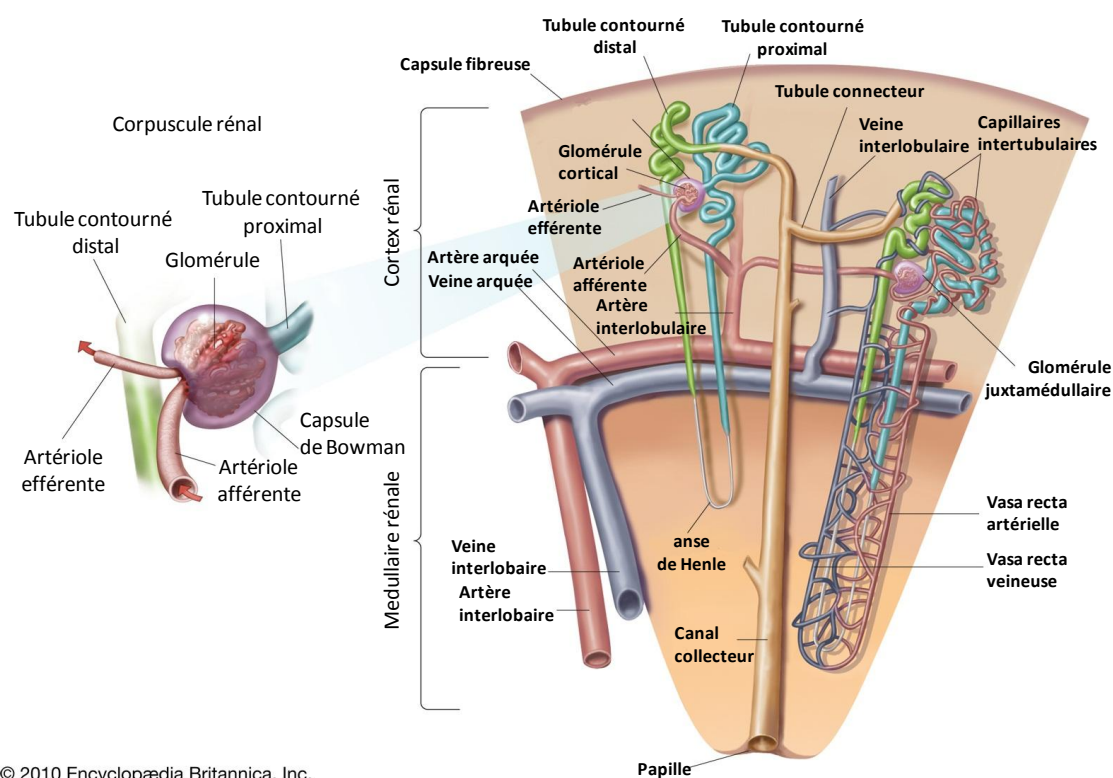
Les CLC-K tiennent leur nom de leur expression que l'on pensait spécifique du rein (K pour Kidney). En réalité, des études chez la souris (Estévez et al. 2001), chez la gerbille (Sage et al. 2001) et chez le rat (Qu et al. 2006) ont montré que les deux CLC-K s'expriment au niveau du rein et de l'oreille interne.

#### a) Localisation rénale du CLC-KB et transports au sein du néphron distal

La figure 8 donne une représentation générale d'un rein humain distinguant zone corticale et zone médullaire. Chaque rein se compose d'environ un million de néphrons associés à des vaisseaux sanguins. Le néphron constitue l'unité structurale et fonctionnelle du rein et est constitué d'un glomérule, dont la fonction est l'ultrafiltration du plasma, et d'un tubule, une structure épithéliale qui assure le transport d'eau et des substances dissoutes. Le tubule rénal est lui-même composé d'une succession de segments morphologiquement différents, comprenant un ou plusieurs types cellulaires aux propriétés de transport et de régulation spécifiques [voir Figure 9].



**Figure 8 :** coupe longitudinale d'un rein humain et néphron en vue détaillée (modifiée d'après Encyclopedia Britannica, Inc.).



© 2010 Encyclopædia Britannica, Inc.

Figure 9 : schéma d'un néphron (modifiée d'après Encyclopedia Britannica, Inc.).

Chaque jour, les reins filtrent environ 25 moles de NaCl, soit 1,5kg de NaCl. Cependant, ils réabsorbent plus de 99% du NaCl filtré et n'en excrètent que quelques millièmes de moles. Le NaCl filtré est réabsorbé tout au long du néphron par des mécanismes variés. Une réabsorption massive s'effectue au niveau du tubule contourné proximal ainsi qu'à un moindre degré dans la branche large ascendante de l'anse de Henle, tandis que les segments les plus distaux (tubule contourné distal, tubule connecteur et canal collecteur) assurent une réabsorption finement régulée permettant le maintien d'une volémie constante, notamment par le biais de l'aldostérone.

Le transport rénal du NaCl obéit à certaines constantes. L'entrée du sodium au pôle apical de la cellule est médiée par un grand nombre de systèmes de transport, différents pour chaque segment du néphron. En revanche, la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase basolatérale est nécessaire à la réabsorption transépithéliale de sodium tout au long de l'épithélium rénal. En effet, en maintenant la concentration intracellulaire de sodium à une valeur basse, elle établit le gradient électrochimique qui permet le fonctionnement d'un grand nombre de transporteurs et de canaux de la membrane apicale. En maintenant le potassium à une concentration intracellulaire élevée, elle règle la valeur du potentiel de repos et permet la diffusion ionique passive, notamment du potassium et du chlorure. Enfin, elle assure seule,



dans la très grande majorité des cas, l'étape basolatérale du transport de sodium (contre son gradient électrochimique). Pour ces raisons, elle est exprimée de façon très abondante dans les cellules épithéliales.

Par opposition au sodium, les mécanismes de transport transcellulaire du chlorure demeurent souvent mal connus, notamment au niveau du canal collecteur. Les canaux chlorure les plus importants pour la fonction rénale sont le CLC-KA et le CLC-KB chez l'homme. Un problème majeur dans la détermination de la localisation des canaux CLC-KA et CLC-KB est l'absence d'anticorps spécifiques, en raison de la très forte homologie de séquence (environ 90 %) entre ces deux protéines. Afin de contourner ce problème et pour localiser précisément le sCLC-K2 et le CLC-KB, une équipe japonaise a eu l'ingéniosité, d'une part d'utiliser un anticorps anti-CLC-K chez des souris KO CLC-K1 (Kobayashi et al. 2001) et d'autre part d'exprimer, chez des souris, l'EGFP sous le contrôle du promoteur du CLC-KB (Kobayashi et al. 2002). Ces études révèlent que le sCLC-K2 et le CLC-KB s'expriment à la membrane basolatérale de la branche large ascendante de l'anse de Henle, du tubule contourné distal et des cellules intercalaires du canal collecteur. L'expression de la barttine reflète celle des CLC-K puisqu'on la retrouve au niveau des segments terminaux du néphron (branche ascendante de l'anse de Henle, tubule contourné distal et canal collecteur) (Birkenhäger et al. 2001 ; Estévez et al. 2001), supportant la notion qu'ils forment des hétéromères *in vivo*.

### **Branche ascendante de l'anse de Henle**

La branche ascendante de l'anse de Henle réabsorbe environ 25% du NaCl via un transport majoritairement transcellulaire. La réabsorption du NaCl au sein de la branche large ascendante de l'anse de Henle se fait selon un mécanisme d'entrée dans la cellule du sodium et du chlorure via le cotransporteur membranaire apical NKCC2, sensible au furosémide, le potassium est recyclé dans la lumière tubulaire via le canal ROMK tandis que le sodium est réabsorbé au pôle basolatéral de la cellule via la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase [voir Figure 10B]. La sortie basolatérale du chlorure s'effectue principalement par des canaux décrits chez la souris à l'aide de la technique du patch-clamp (Teulon et al. 2005). Deux d'entre eux correspondent vraisemblablement aux CLC-KA et CLC-KB, l'identité du troisième canal est inconnue. D'autres études ont démontré la présence des CLC-K accompagnés de leur sous-unité régulatrice la barttine (Uchida et al. 1995 ; Birkenhäger et al. 2001 ; Estévez et al. 2001 ; Kobayashi et al. 2001 ; Kobayashi et al. 2002). Enfin, la différence de



potentiel transépithélial positive permet la réabsorption paracellulaire de sodium, calcium, magnésium et potassium, accompagnée d'une rétrodiffusion de chlorure [voir Figure 10B].

Le transport de NaCl au sein de la branche fine ascendante de l'anse de Henle est, quant à lui, moins connu. Cependant, il semblerait que le chlorure soit réabsorbé exclusivement via le canal CLC-KA, présent au niveau des membranes apicales et basolatérales (Uchida et al. 1995) ou uniquement au pôle basolatéral (Vandewalle et al. 1997), tandis que le sodium diffuserait par la voie paracellulaire (Imai et al. 1976) [voir Figure 10A].

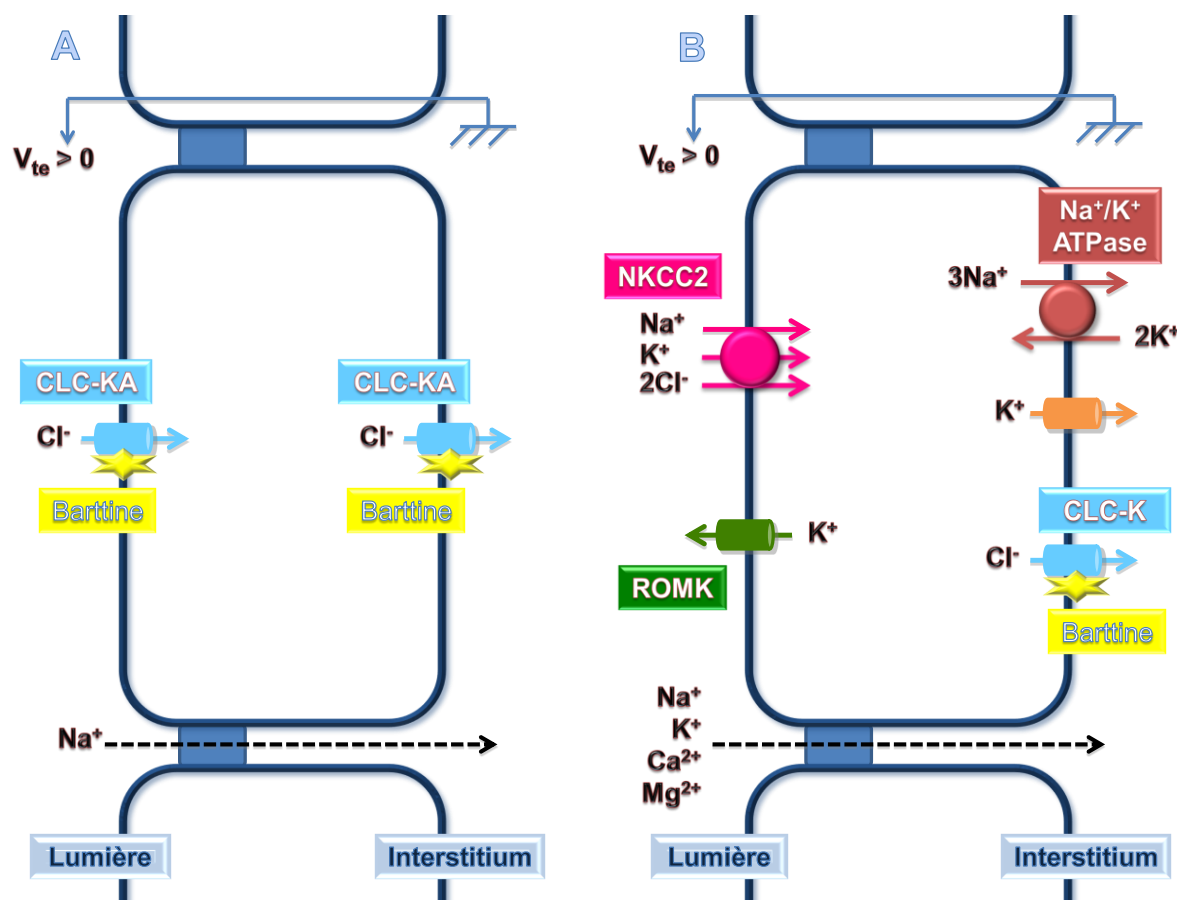


Figure 10 : schéma de la réabsorption de NaCl au sein de la branche fine (A) et de la branche large (B) ascendantes de l'anse de Henle.

### Tubule contourné distal

La régulation fine de la réabsorption du NaCl commence dans le tubule contourné distal où environ 5% du NaCl est récupéré par l'organisme. Cette réabsorption se fait de façon exclusivement transcellulaire selon un mécanisme d'entrée de sodium et de chlorure au pôle apical de la cellule via le cotransporteur NCC, sensible aux thiazides, et le canal ENaC, sensible à l'amiloride, qui est uniquement présent dans la partie terminale du tubule contourné distal [voir Figure 11]. Au pôle basolatéral de la cellule, le sodium et le chlorure

sont respectivement réabsorbés via la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase et le canal CLC-KB [voir Figure 11]. En effet, chez la souris plusieurs études de patch-clamp en canal unitaire ont montré la présence d'un seul canal de 10pS dont les propriétés sont celles attendues pour CLC-K2 (Lourdel et al. 2003 ; Teulon et al. 2005). On ne peut cependant exclure que ces cellules montrent des quantités mineures de CLC-KA. En effet, des études de RT-PCR en cellule unique à partir de tubules contournés distaux de souris microdisséquées montrent que le sCLC-K2 s'exprime aussi bien dans les cellules initiales que les cellules terminales, tandis que le sCLC-K1 est localisé préférentiellement dans les cellules terminales (Nissant et al. 2004). Le magnésium et le calcium sont, quant à eux, réabsorbés via un transport transcellulaire, respectivement au niveau initial et terminal du tubule contourné distal [voir Figure 11].

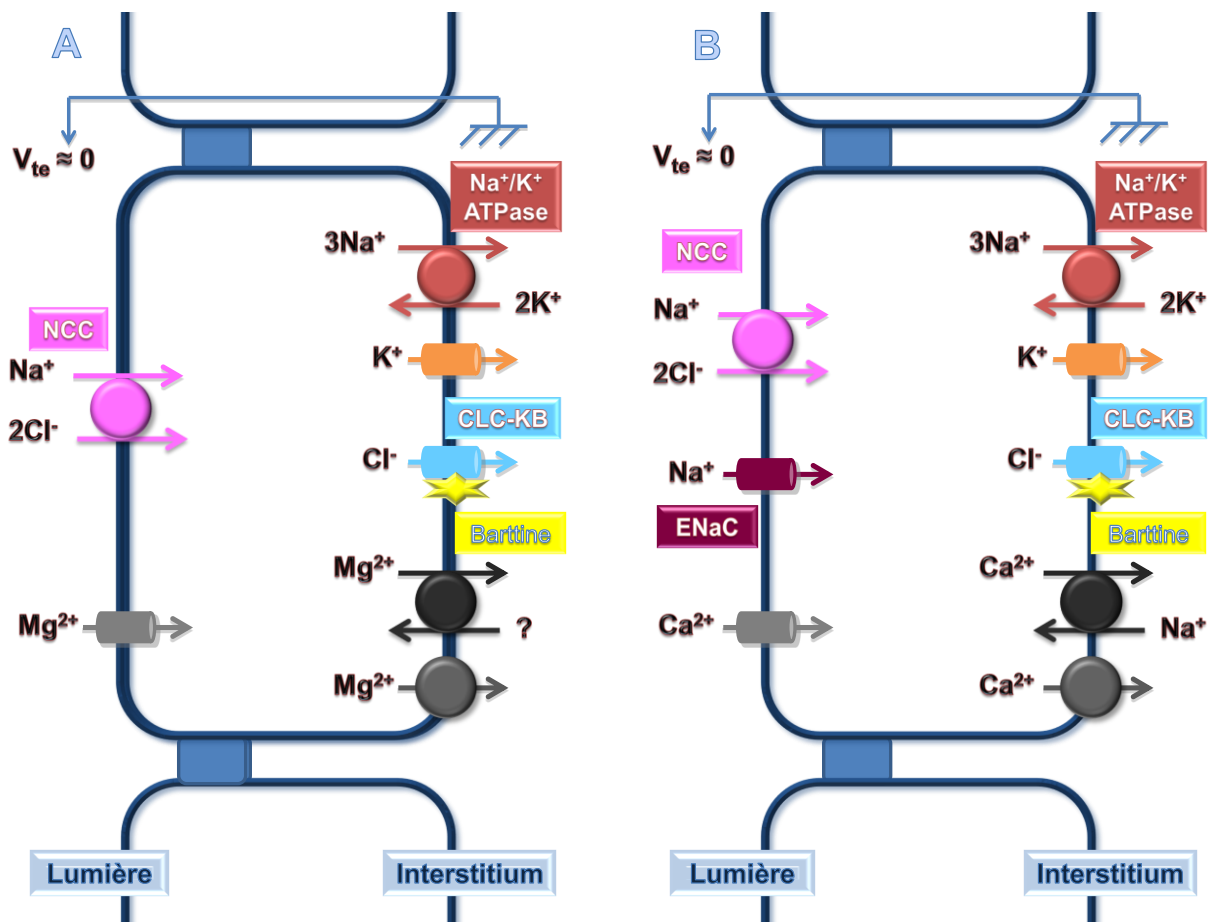


Figure 11 : schéma de la réabsorption de NaCl au sein des parties initiale (A) et terminale (B) du tubule contourné distal.

### Tubule connecteur et du canal collecteur

Enfin, environ 3% du NaCl filtré est réabsorbé au niveau du tubule connecteur et du canal collecteur. Cette dernière portion d'épithélium rénal est hautement spécialisée et

hétérogène, et se caractérise par deux grands types cellulaires : les cellules principales et les cellules intercalaires.

Les cellules principales réabsorbent le sodium au pôle apical via le canal ENaC qui génère la force de conduction nécessaire à la sécrétion de potassium par le canal ROMK. La pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase assure, quant à elle, la réabsorption de sodium au pôle basolatéral [voir Figure 12A]. L'entrée apicale de sodium via ENaC, tout comme sa sortie basolatérale via la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase sont toutes deux augmentées par l'aldostérone (Rossier et al. 2008). En effet, une sécrétion excessive d'aldostérone peut entraîner une hypertension du fait d'une rétention de sodium et d'un volume du milieu intérieur augmenté. Inversement, un défaut de sécrétion d'aldostérone engendre une perte de sodium qui génère une hypovolémie et une baisse de la tension artérielle. Il est à noter que l'aldostérone, en contrôlant le canal ENaC, règle la force motrice de sécrétion du potassium vers la lumière tubulaire. De ce fait, un hyperaldostéronisme peut être source d'une hypokaliémie et un hypoaldostéronisme source d'une hyperkaliémie. Les cellules principales jouent également un rôle majeur dans la réabsorption d'eau via l'expression des aquaporines 2, 3 et 4. Ces deux dernières, sont exprimées constitutivement à la membrane plasmique basolatérale, tandis que l'AQP2, stockée dans des vésicules sous-membranaires, doit être phosphorylée afin d'atteindre la membrane plasmique apicale, cette phosphorylation étant médiée par l'interaction de la vasopressine/hormone antidiurétique avec ces récepteurs basolatéraux (Kwon et al. 2009) [voir Figure 12A].

Il existe au moins deux sous-types de cellules intercalaires : les cellules intercalaires  $\alpha$  et  $\beta$ . Les cellules intercalaires  $\alpha$  sécrètent des protons par l'intermédiaire d'une pompe à protons apicale, réabsorbent des ions bicarbonate via l'échangeur  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  AE1 et enfin la réabsorption basolatérale de chlorure est médiée par les canaux CLC-K et leur sous-unité régulatrice, la barttine (données non publiées du laboratoire ; Estévez et al. 2001 ; Kobayashi et al. 2001 ; Kobayashi et al. 2002) [voir Figure 12B]. Les cellules intercalaires  $\beta$  réabsorbent, quant à elles, le chlorure à travers les échangeurs pendrine et NDCBE, récemment identifié (Leviel et al. 2010), au pôle apical et via le canal CLC-KB associé à la barttine au pôle basolatéral (Estévez et al. 2001 ; Kobayashi et al. 2001 ; Kobayashi et al. 2002 ; Nissant et al. 2006) [voir Figure 12C]. Elles sécrètent également des ions bicarbonate par l'intermédiaire de la pendrine et réabsorbent des protons au pôle basolatéral via la pompe à proton [voir Figure 12C].

En dernier lieu, une hypothèse controversée fait mention d'un transport paracellulaire de chlorure au niveau du canal collecteur (Tanaka et al. 1997 ; Hou et al. 2010).

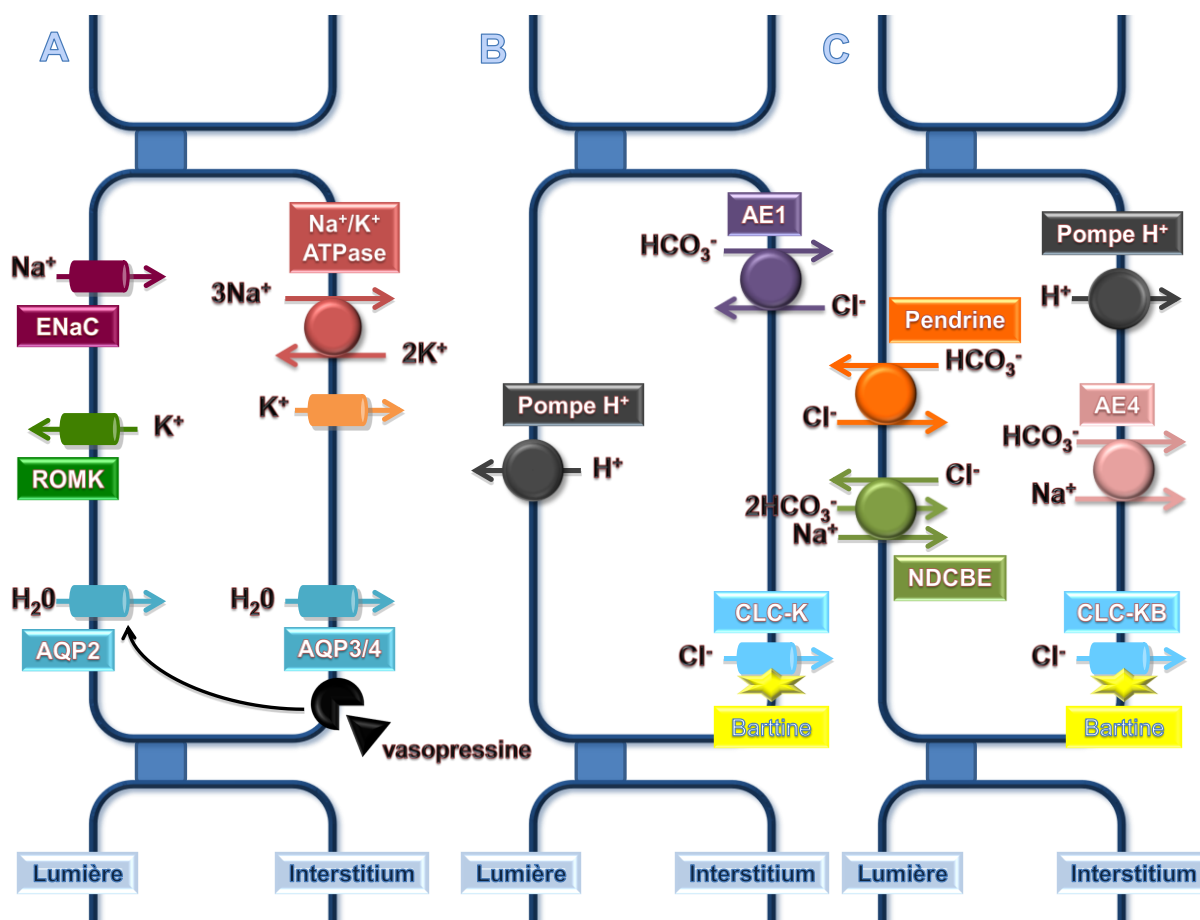


Figure 12 : schéma de la réabsorption de NaCl au sein des cellules principales (A), des cellules intercalaires α (B) et des cellules intercalaires β (C) du tubule connecteur et du canal collecteur.

### b) Fonctions rénales du CLC-KB

#### Transport de NaCl et établissement du gradient de concentration cortico-papillaire

La portion fine de la branche ascendante de l'anse de Henle, présente uniquement dans les néphrons profonds, participe à une absorption passive de NaCl non associée à un mouvement d'eau. On admet donc, sans savoir en expliquer totalement le mécanisme, que ce segment du néphron est à l'origine du gradient de concentration cortico-papillaire dans la médulla interne. À cette localisation n'est présent que le canal CLC-KA.

La portion large de la branche ascendante de l'anse de Henle, qui traverse la médulla externe et une partie du cortex, a deux fonctions principales. En premier lieu, elle contribue pour 25% à l'absorption de NaCl. En second lieu, l'absorption de NaCl en l'absence

de mouvement d'eau favorise la dilution de l'urine en formation (un processus continué ensuite par le tubule contourné distal). Cela permet d'établir une différence de pression osmotique entre la lumière tubulaire et l'interstitium, qui permet une importante réabsorption d'eau au niveau du canal collecteur (Fahlke et al. 2010). Enfin, la portion large de la branche ascendante de l'anse de Henle est moteur de la création du gradient de concentration cortico-papillaire dans la médullaire externe, qui va permettre de concentrer l'urine. Il semble que les canaux CLC-KA et CLC-KB soient présents dans la branche large ascendante de l'anse de Henle tandis que seul le canal CLC-KB est détecté dans le tubule contourné distal (Uchida et al. 1995 ; Estévez et al. 2001 ; Lourdel et al. 2003 ; Teulon et al. 2005).

### Équilibre acido-basique

Les cellules intercalaires  $\beta$  ont un rôle reconnu, celui de sécréter du bicarbonate en échange de chlorure, lorsque c'est nécessaire, grâce à la présence d'un échangeur chlorure-bicarbonate à la membrane apicale et du CLC-KB à la membrane basolatérale (Kobayashi et al. 2001 ; Kobayashi et al. 2002 ; Nissant et al. 2006). Les cellules intercalaires  $\alpha$  sont, quant à elles, le siège d'une sécrétion de protons par le biais d'une pompe  $H^+$  apicale, d'un échangeur chlorure-bicarbonate basolatéral et des canaux chlorure CLC-K basolatéraux optimisant le transfert de bicarbonate (données non publiées du laboratoire ; Kobayashi et al. 2001 ; Kobayashi et al. 2002). Ces deux sous-types de cellules intercalaires et, par extension, le CLC-KB, sont donc impliqués dans la régulation acide-base.

Les mutations perte de fonction du CLC-KB résultent en un syndrome de Bartter qui se traduit par une perte massive rénale de sel, une polyurie, un hyperaldostérionisme secondaire, une hypokaliémie et une alcalose métabolique (Simon et al. 1997). Le CLC-KB et la barttine s'expriment, dans le rein, à la membrane basolatérale de la branche large ascendante de l'anse de Henle, du tubule contourné distal et des cellules intercalaires du canal collecteur (Estévez et al. 2001 ; Kobayashi et al. 2001 ; Kobayashi et al. 2002). L'ensemble de tous ces éléments indique donc le rôle essentiel de ce canal chlorure dans la réabsorption de NaCl, l'établissement du gradient de concentration cortico-papillaire et l'équilibre acido-basique au niveau des segments terminaux du néphron.

### Régulation de la pression sanguine

Les importants travaux de Guyton et de ses collaborateurs ont établi de façon définitive que les reins jouaient un rôle essentiel dans la régulation à long terme de la

pression artérielle en régulant le contenu en sodium de l'organisme (Guyton et al. 1986). Les mêmes auteurs ont également mis en évidence la natriurèse de pression et démontré avec d'autres le rôle fondamental du système rénine-angiotensine-aldostéone. Dans la perspective de ces travaux, le chlorure n'a que le rôle secondaire d'assurer l'électroneutralité. Cependant, un certain nombre d'études ont introduit l'idée que l'ion chlorure pourrait jouer un rôle plus direct dans la régulation de la pression artérielle. Ainsi un régime sodé, sans apport de chlorure, ne permet pas d'induire une hypertension chez des patients et des animaux sensibles au sel (Kurtz et al. 1987; Kurtz et al. 1984 ; Whitescarver et al. 1984). En outre, d'autres études démontrent que la substitution de  $\text{NaHCO}_3$  au  $\text{NaCl}$  dans la diète induit une réduction de la pression sanguine chez des sujets normaux ou hypertendus (Luft et al. 1990 ; Schorr et al. 1996). Le lien causal entre chlorure et pression artérielle reste cependant mystérieux.

Le transport de chlorure est directement lié à celui du sodium dans la portion large de la branche ascendante de l'anse de Henle et dans le tubule contourné distal. Il est bien connu que l'inhibition des transports couplés sodium-chlorure dans ces segments par le furosémide et les thiazidiques, les deux diurétiques classiques, produit une perte de sel associé à une hypovolémie. On sait également que des mutations perte de fonction des différents transporteurs ou canaux de ces segments sont à l'origine des syndromes de Bartter et Gitelman, des maladies à perte de sel avec une tension normale-basse.

Au niveau du tubule connecteur et du canal collecteur, la réabsorption de sodium n'est pas moléculairement liée au transport de chlorure, puisque, comme nous l'avons déjà mentionné plus haut, le sodium emprunte le canal apical ENaC et la pompe basolatérale  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase au niveau des cellules principales, tandis que le chlorure est réabsorbé à travers les cellules intercalaires et éventuellement par la voie paracellulaire. Un rôle éventuel du chlorure dans la régulation à long terme de la pression artérielle est cependant suggéré par des études sur les transporteurs des cellules intercalaires. En effet, l'inactivation de la pendrine, un échangeur  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  localisé dans les cellules intercalaires  $\beta$ , favorise l'hypotension chez les souris KO lorsque celles-ci sont soumises à un régime déplété en  $\text{NaCl}$  (Wall et al. 2004) ou les protège contre une hypertension induite par les minéralocorticoïdes (Verlander et al. 2003). Or, une étude utilisant les souris KO pour la pendrine démontre que la sécrétion de bicarbonate dépendante de la pendrine au sein des cellules intercalaires  $\beta$  est nécessaire à une expression et une fonction normale d'ENaC (Pech et al. 2010). Cela pourrait

signifier que les cellules principales et intercalaires seraient coordonnées par des facteurs locaux paracrines qui doivent encore être identifiés et caractérisés.

Différents éléments de la littérature suggèrent que les canaux chlorure rénaux CLC-K pourraient avoir un rôle physiopathologique dans le contrôle de la pression artérielle. Il a été démontré que des mutations du gène *CLCNKB*, codant pour le canal chlorure CLC-KB, peuvent être à l'origine de syndromes de Bartter et Gitelman et donc influencer sur la volémie. En outre, le groupe de Conte Camerino a récemment démontré qu'un bloquant des canaux chlorure CLC-K pourrait avoir des effets similaires à celui du furosémide (Liantonio et al. 2006). De même, Capasso et al. ont montré que, chez des rats hypertendus, les caractéristiques électrophysiologiques des canaux CLC-K ne variaient pas mais que le nombre de canaux actifs augmentait (Capasso et al. 2008). De plus, des analyses suggèrent que plusieurs polymorphismes des canaux CLC-K prédisposeraient à l'hypertension (Jeck et al. 2004(a) ; Jeck et al. 2004(b) ; Milton et al. 2006 ; Sile et al. 2009 ; Barlassina et al. 2007). Enfin, signalons que les canaux chlorure CLC-K sont exprimés à la membrane basolatérale des cellules de la macula densa. La macula densa est un intermédiaire important dans le système rénine-angiotensine-aldostérone puisqu'elle est l'un des trois médiateurs de la sécrétion de rénine avec les barorécepteurs locaux et l'innervation sympathique. Dans les cellules de la macula, la baisse de la concentration luminale de chlorure est captée par le cotransporteur NKCC2, probablement en faisant varier le niveau de chlorure intracellulaire. Ceci provoque une sécrétion de PGE2 qui va stimuler les cellules à rénine. Il est alors vraisemblable qu'un dysfonctionnement des canaux chlorure CLC-K basolatéraux de la macula densa puisse perturber fortement la signalisation vers les cellules à rénine.

Ainsi, durant ces dix dernières années, de nouvelles découvertes, correspondantes à la reconnaissance de l'importance de la régulation du transport de chlorure et l'identification de nouvelles protéines de réabsorption du sodium et du chlorure au sein des cellules intercalaires (pendrine et NDCBE), ont modifié en profondeur notre compréhension du transport de NaCl le long du néphron. Ces nouveaux concepts démontrent l'importance du transport de chlorure, notamment via les canaux CLC-K, dans la régulation de la pression sanguine et devraient permettre d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans diverses pathologies, telle que l'hypertension sensible au sel.

### c) Localisation dans l'oreille interne du CLC-KB

Les CLC-K s'expriment également au niveau de l'oreille interne (Estévez et al. 2001 ; Sage et al. 2001 ; Qu et al. 2006) et plus précisément au niveau de la membrane basolatérale des cellules marginales de la strie vasculaire (Estévez et al. 2001). L'expression de la barttine se retrouve au niveau de ces mêmes cellules (Birkenhäger et al. 2001 ; Estévez et al. 2001).

Les cellules marginales de la strie vasculaire sont des cellules épithéliales impliquées dans la sécrétion de potassium, via le complexe KCNQ1/KCNE1, au niveau de l'endolymphe. Elles récupèrent ce potassium au pôle basolatéral via la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase et le cotransporteur NKCC1 dont la force motrice est issue de la réabsorption de sodium par la pompe. Le chlorure est recyclé par les canaux CLC-K accompagné de leur sous-unité régulatrice, la barttine. L'échangeur NHE3 et le canal ENaC assurent la réabsorption apicale de sodium. Enfin, la pompe  $\text{H}^+$ -ATPase est impliquée dans la sécrétion active de protons [voir Figure 13].

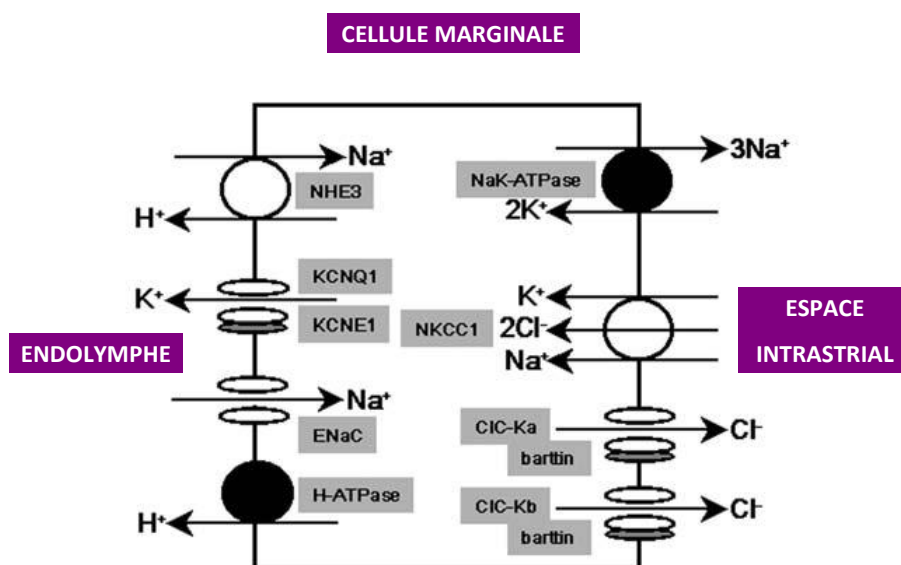


Figure 13 : schéma des différents transporteurs au sein d'une cellule marginale de la strie vasculaire (d'après Peters et al. 2004).

### d) Fonction de maintien du potentiel endocochléaire nécessaire à l'audition

Les mutations perte de fonction de la barttine (Birkenhäger et al. 2001) ou les mutations digéniques de CLC-KA et CLC-KB (Nozu et al. 2008 ; Schlingmann et al. 2004) résultent en un syndrome de Bartter de type IV qui combine une surdité congénitale avec



des symptômes rénaux plus sévères que ceux observés lors de la perte unique de CLC-KB. Les deux CLC-K et la barttine co-localisent, dans l'oreille interne, à la membrane basolatérale des cellules marginales de la strie vasculaire qui sont des cellules épithéliales sécrétant du potassium dans le canal cochléaire (Estévez et al. 2001) [voir Figure 13]. Ces observations soulignent la fonction redondante de CLC-KB et CLC-KA au niveau de l'oreille interne.

Une audition normale nécessite, d'une part, le maintien d'une importante concentration de  $K^+$  au niveau de l'endolymphe et, d'autre part, la génération d'un potentiel endocochléaire positif (+90mV). Or, le modèle de souris KO barttine spécifique de l'oreille interne, où les souris présentent surdité sans atteinte rénale ni d'altération morphologique cochléaire, démontre que la haute concentration potassique de l'endolymphe est normale mais que le potentiel endocochléaire positif est fortement diminué (Rickheit et al. 2008). Les hétéromères CLC-K/Barttine sont donc essentiels au maintien du potentiel endocochléaire positif préservant ainsi l'audition.

Il a été rapporté une mutation homozygote de la barttine, conservant la fonctionnalité des deux CLC-K et affectant uniquement de façon partielle le trafic des CLC-K, qui entraîne une surdité sans atteinte rénale (Riazuddin et al. 2009). De façon opposée, la perte du CLC-KB entraîne des symptômes rénaux sans surdité. Ceci indique donc que, dans l'oreille interne, une seule des deux isoformes CLC-K peut compenser un défaut génétique de l'autre (ce qui n'est pas vrai au niveau du rein lors des mutations de CLC-KB). En contraste, un défaut modéré de la fonction « chaperonne » de la barttine montre que l'oreille interne est plus sensible à la réduction des conductances chlorure que le rein.

### 3. Le syndrome de Bartter

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les mutations du canal chlorure CLC-KB entraînent un syndrome de Bartter. Cette troisième partie sera donc consacrée à l'étude de cette maladie rare.

#### 3.1. Phénotypes et traitements

Le syndrome de Bartter est une maladie rare autosomique récessive dont la prévalence s'élève à un pour un million (Devuyst 2008). Elle se caractérise par une perte rénale de sel, une polyurie, un hyperaldostéronisme secondaire, une hypokaliémie, une alcalose métabolique, et une pression sanguine normale à basse (Hebert 2003 ; Fahlke et al. 2010). Le syndrome de Bartter, décrit la première fois par l'endocrinologue Frederic Bartter (Bartter et al. 1962), forme un groupe hétérogène de maladies tubulaires pouvant être classifiées en 2 groupes distincts : le syndrome de Bartter anténatal et classique.

Le syndrome de Bartter anténatal, aussi appelé syndrome d'hyperprostaglandine E du fait de très hauts niveaux de prostaglandine E2 dans le sang et l'urine, est la forme la plus sévère (Hebert 2003). La perte de sel et d'eau entraîne un polyhydramnios anténatal se traduisant majoritairement par une naissance prématurée. Ces enfants présentent une polyurie postnatale compliquée par de sévères épisodes de déshydratation, des vomissements, des retards de croissance, des faiblesses musculaires, une hypercalciurie et développent parfois une néphrocalcinose (Briet et al. 2006 ; Brochard et al. 2009). Une des variantes du syndrome de Bartter anténatal, associé à une surdité, est particulièrement sévère et la majorité des patients développent très tôt une insuffisance rénale (Briet et al. 2006).

Le syndrome de Bartter classique est généralement diagnostiqué durant l'enfance et se traduit par des retards de croissance, des faiblesses musculaires, une hyper ou normocalciurie, mais l'insuffisance rénale et la néphrocalcinose sont rares (Briet et al. 2006 ; Brochard et al. 2009).

Dans certains cas, on observe un syndrome mixe Bartter-Gitelman. Le syndrome de Gitelman, dont la prévalence est de vingt pour un million (Devuyst 2008), est une maladie moins sévère que le syndrome Bartter car elle souvent une cause d'hypokaliémie asymptomatique et est diagnostiquée de la fin de l'enfance à la vie adulte. Ce syndrome,

décrit la première fois en 1966 (Gitelman et al. 1966), se caractérise par une perte rénale de sel, un hyperaldostérionisme secondaire, une hypokaliémie, une hypocalciurie, une hypomagnésémie et entraîne des faiblesses musculaires, et parfois des attaques épileptiques aiguës à l'âge adulte (Briet et al. 2006 ; Brochard et al. 2009 ; Pearce 1998). L'hypocalciurie et l'hypomagnésémie distinguent le syndrome de Gitelman du syndrome de Bartter, caractérisé plutôt par une hypercalciurie (Briet et al. 2006 ; Pearce 1998).

Le furosémide, un diurétique de la branche large ascendante de l'anse de Henle, mime les effets du syndrome de Bartter, tandis que l'hydrochlorothiazide, un diurétique du tubule contourné distal, reflète les caractéristiques du syndrome de Gitelman (Unwin et al. 2006). Dans le cas d'abus de diurétiques, le terme de pseudo-Bartter est souvent utilisé.

Différentes caractéristiques du syndrome de Bartter s'expliquent aisément :

- la perte rénale de sel reflète le défaut de réabsorption du NaCl au niveau de la branche large ascendante de l'anse de Henle, dans le cas du Bartter, ou du tubule contourné distal, dans le cas du Gitelman.
- la polyurie, distinctive du syndrome de Bartter, résulte du défaut de réabsorption du NaCl au niveau de la branche large ascendante de l'anse de Henle qui entraîne une diminution du gradient de concentration cortico-papillaire et donc un défaut de concentration urinaire.
- l'hyperaldostérionisme secondaire résulte de la diminution de la réabsorption du NaCl (hypovolémie). Il a pour conséquence une activation du canal ENaC au niveau des cellules principales du canal collecteur qui tend à compenser la perte de sodium.
- l'hypokaliémie est une conséquence indirecte de l'activation du canal ENaC. L'augmentation concomitante du gradient électrochimique pour le potassium à travers la membrane apicale se traduit par une augmentation de la sécrétion de  $K^+$  par le canal ROMK au niveau des cellules principales du canal collecteur.
- l'hypercalciurie, représentative du syndrome de Bartter, provient de la diminution de la réabsorption paracellulaire de calcium au niveau de la branche large ascendante de l'anse de Henle car le potentiel transépithélial diminue à la suite du défaut de réabsorption du NaCl. De ce fait, on s'attendrait à observer une hypermagnésurie dans le syndrome de Bartter puisque 80% du magnésium est absorbé dans la branche large ascendante. On admet cependant que la diminution de la réabsorption paracellulaire de magnésium au niveau de la branche large ascendante de l'anse de Henle est compensée au niveau du tubule contourné distal.

À l'heure actuelle, on ne dispose pas de traitement médical spécifique du syndrome de Bartter mais seulement de traitements d'appoint. Ainsi, des supplémentations en eau et électrolytes (NaCl, KCl) en association avec de l'indométacine (un inhibiteur de cyclooxygénases 1 et 2), des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou du récepteur 2 de l'angiotensine, des antagonistes de l'aldostérone (ex: eplerenone, spironolactone), de l'amiloride (un inhibiteur d'ENaC) sont indiqués pour réduire la perte de sel et l'hypokaliémie et stabiliser, voir relancer, la croissance et (Brochard et al. 2009). Des implants cochléaires peuvent être proposés dans les cas de surdité.

Caractéristiques	Syndrome de Bartter anténatal	Syndrome de Bartter classique	Syndrome de Gitelman
Diagnostique	Période néonatale	Enfance	Enfance ou après
Polyhydramnios maternel	Commun	Rare	Absent
Polyurie	Marquée	Présente	Absente
Déshydratation	Présente	Souvent présente	Absente
Retard de croissance	Présent	Présent	Absent
Tétanie	Absent	Absent	Présent
Néphrocalcinose	Présente	Rare	Absente
Calcium urinaire	Très élevé	Normal ou élevé	Bas
Magnésium plasmatique	Normal	Normal	Bas
Prostaglandines urinaires	Très élevées	Normales ou élevées	Normales
Réponse à l'indométhacine	Bonne	Bonne	Absente

Tableau 2 : caractéristiques différenciant les syndromes de Bartter et de Gitelman.

### 3.2. Données génétiques

Le syndrome de Bartter anténatal est majoritairement dû à l'inactivation du gène *SLC12A1* codant le cotransporteur NKCC2 (syndrome de Bartter de type I) (Simon, Karet, Hamdan et al. 1996) ou du gène *KCNJ1* codant le canal potassique ROMK (syndrome de Bartter de type II) (Simon, Karet, Rodriguez-Soriano et al. 1996) [voir Figure 14A]. Le sous-type de Bartter anténatal associé à une surdité résulte majoritairement de mutations du gène *BSND* codant la sous-unité de régulatrice des CLC-K, la barttine (syndrome de Bartter de type IVa) (Birkenhäger et al. 2001), mais également de mutations digéniques des canaux chlorures CLC-KA et CLC-KB (syndrome de Bartter type IVb) (Schlingmann et al. 2004 ; Nozu et al. 2008) [voir Figure 14A].

Le syndrome de Bartter classique est, quant à lui, généralement causé par les mutations du gène *CLCNKB* codant le canal chlorure CLC-KB (syndrome de Bartter de type III) (Simon et al. 1997) [voir Figure 14A]. Un dernier sous-type de syndrome de Bartter classique a été attribué aux mutations gain de fonction du gène *CASR* qui code le récepteur au calcium CaSR localisé au niveau de la membrane basolatérale de la branche large ascendante de l'anse de Henle (syndrome de Bartter de type V) [voir Figure 14A]. L'activation constitutive de CaSR exerce un effet inhibiteur sur la réabsorption de NaCl via une inhibition de NKCC2 et ROMK (Hebert 2003 ; Briet et al. 2006).

Il existe deux sous-types de syndrome de Gitelman, le premier est dû aux mutations du gène *SLC12A3* codant le cotransporteur NCC au niveau de la membrane apicale du tubule contourné distal et concerne la grande majorité des patients (Lemmink et al. 1996) [voir Figure 14B]. Plus récemment, un second sous-type a été décrit et résulte de mutations du gène *CLCNKB*, démontrant ainsi que le canal CLC-KB est également impliqué dans la sortie basolatérale de chlorure au niveau des cellules du tubule contourné distal (Briet et al. 2006) [voir Figure 14B].

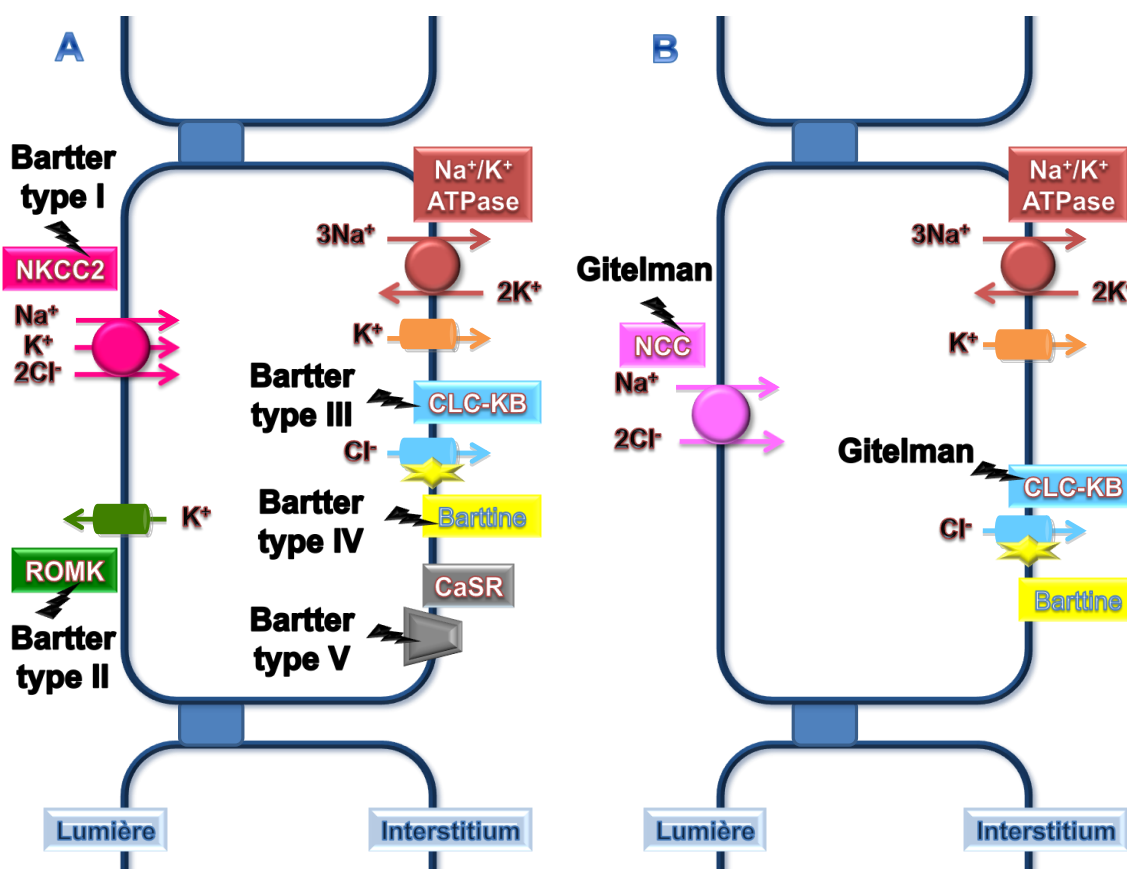


Figure 14 : schéma des différentes protéines impliquées dans le syndrome de Bartter au sein de la branche large ascendante de l'anse de Henle (A) et dans le syndrome de Gitelman au sein du tubule contourné distal (B).

Les différents types de syndrome de Bartter, décrits précédemment, présentent une hétérogénéité clinique. Dans le cas du Bartter de type 3, certaines mutations du canal CLC-KB conduisent à un phénotype classique, d'autres à un phénotype anténatal, d'autres encore à un mixte Bartter-Gitelman (Jeck et al. 2000 ; Nozu et al. 2007 ; Zelikovic et al. 2003). Cette variabilité s'explique par le fait que, d'une part, il peut exister chez certains patients des voies alternatives de réabsorption du chlorure et que, d'autre part, plus généralement, des variants alléliques « hyperactifs » de gènes codant pour des canaux/cotransporteurs ou pour des protéines régulatrices du transport (exemple : les protéines kinases SGK1 et WNK) pourraient atténuer la perte rénale de sel (Brochard et al. 2009).

Dans le cas du Bartter de type IVa, l'évolution vers l'insuffisance rénale est très fréquente. Cependant, chez un patient, la mutation G47R de la barttine produit un phénotype modéré sans polyhydramnios ni perte sévère de sel pendant la période néonatale (Miyamura et al. 2003). Une étude électrophysiologique a montré par la suite que les deux canaux CLC-K restaient fonctionnels mais que la liaison de la barttine mutée aux CLC-K était moins efficace (Janssen et al. 2009). Une autre mutation homozygote I12T de la barttine cause une surdité sans atteinte rénale et n'est pas accompagnée d'autres symptômes tels que les faiblesses musculaires ou encore le retard de croissance (Riazuddin et al. 2009). Cette mutation affecte de façon partielle le trafic des CLC-K sans altérer leur fonctionnalité (Riazuddin et al. 2009). De façon opposée, la perte du CLC-K entraîne des symptômes rénaux sans surdité. Ceci indique donc que la présence d'une seule isoforme CLC-K fonctionnelle suffit à assurer une fonction normale de l'oreille interne, ce qui n'est pas vrai au niveau du rein lors des mutations de CLC-KB. L'ensemble de ces études suggère l'existence de formes différentes de syndrome de Bartter de type IVa selon le niveau de dysfonction de la barttine chez des patients atteints de surdité congénitale d'origine inconnue.

Les différents types de syndrome de Bartter peuvent être causés par diverses mutations telles que les mutations non-sens, les mutations faux-sens, les mutations entraînant un décalage du cadre de lecture (insertion/délétion), les grandes délétions ou encore les mutations altérant l'épissage. Selon la base de données « Human Gene Mutation Database » ([www.hgmd.org](http://www.hgmd.org)), la majorité des mutations *SLC12A1* et *KCNJ1* sont des mutations faux-sens. Ces défauts, présents soit à l'état homozygote soit à l'état hétérozygote composite c'est-à-dire que les deux allèles portent deux mutations différentes,

peuvent alors affecter la synthèse, la maturation, le trafic, l'activité et la régulation de la protéine.

### 3.3. Apports des modèles animaux

C'est dans les années 2000 qu'ont été élaborés plusieurs modèles de souris KO dans le but de relier la physiopathologie des différents types de syndrome de Bartter à la fonction des protéines NKCC2, ROMK, CLC-KB, barttine et CaSR.

L'inactivation, par recombinaison homologue, du gène *SLC12A1* codant le cotransporteur NKCC2 se traduit par des naissances de souriceaux dans les proportions attendues (Takahashi et al. 2000). Cependant, ils montrent rapidement des signes de déplétion du volume extracellulaire (hématocrite élevée), des problèmes de croissance, une insuffisance rénale, une hyperkaliémie, une acidose métabolique, une hydronéphrose et une concentration de rénine plasmatique élevée. Aucun des souriceaux ne survit jusqu'au sevrage. Les souriceaux ont alors été traités à l'indométhacine dès le premier jour après la naissance, le traitement prévenant le retard de croissance et permettant la survie de 10% des souris jusqu'à 3 semaines. Les souris ayant survécu présentent une sévère polyurie, une extrême hydronéphrose, une hypokaliémie, une alcalose métabolique, une hypercalciurie et une protéinurie. Des souris sauvages traitées avec du furosémide montrent un phénotype similaire à celui des souris KO NKCC2 sauvées par l'indométhacine, à l'exception de l'hydronéphrose qui est plus modérée. La polyurie, l'hypercalciurie et la protéinurie des souris KO NKCC2 traitées à l'indométhacine et des souris sauvages traitées au furosémide sont insensibles aux inhibiteurs du système rénine-angiotensine et à la vasopressine, indiquant que la perte de NKCC2 n'est pas compensée autre part dans le néphron. Les souriceaux KO NKCC2 non-traités à l'indométhacine montrent clairement un phénotype différent des humains atteints d'un syndrome de Bartter type I.

L'inactivation, par recombinaison homologue, du gène *KCNJ1* codant le canal potassique ROMK entraîne une hydronéphrose et une sévère déshydratation des souris se traduisant par un taux de mortalité des souris de 95% avant l'âge de 3 semaines (Lorenz et al. 2002). Les souris qui survivent ont une acidose métabolique, une élévation de la natrémie, une pression sanguine diminuée, une polyurie, une polydipsie et un important défaut de concentration urinaire, mais pas d'hypokaliémie. Le taux de filtration glomérulaire du rein total est diminué, la réabsorption du NaCl au niveau de la branche large ascendante

de l'anse de Henle est diminuée mais pas abolie et le rétrocontrôle tubuloglomérulaire est fortement atteint.

Ces deux modèles ne sont pas vraiment représentatifs de la maladie humaine, en particulier du fait de l'acidose et de l'absence d'hypokaliémie. Le fort taux de mortalité post-natale et l'insuffisance rénale résultant de l'hydronéphrose chez les survivantes rendent difficiles l'interprétation physiopathologique des observations. Cependant, une autre équipe a développé, via différents croisements, des souris KO ROMK présentant un plus haut taux de survie (environ 25%) et montrant une hydronéphrose modérée voire une absence d'hydronéphrose qui représentent un bon modèle d'étude concernant la physiopathologie et le traitement du syndrome de Bartter (Lu et al. 2002). Les souris qui survivent montrent une polyurie, une perte rénale de sel, un hémocrite élevé en lien avec la légère déplétion du volume extracellulaire, une kaliémie normale et, malgré la perte de ROMK prouvée par immunocytochimie et patch-clamp, une augmentation de la kaliurèse indiquant l'existence d'un mécanisme alternatif de sécrétion potassique.

Il existe différentes hypothèses pouvant expliquer les divergences observées entre les modèles de syndrome de Bartter et les patients. L'acidose métabolique serait attribuable à l'hydronéphrose. De plus, elle est parfois présente chez certains patients présentant des mutations de NKCC2 (Takahashi et al. 2000). L'élévation de la natrémie serait due à l'absence d'hyperaldostéronémie chez la souris, il n'existe donc pas de suractivation du canal ENaC et il y aurait alors davantage de perte d'eau. De plus, cette élévation est présente chez certains patients présentant des mutations de NKCC2 (Takahashi et al. 2000). Le rétrocontrôle tubuloglomérulaire fortement diminué chez les souris KO ROMK serait observable car ROMK s'exprimerait à la membrane apicale des cellules de la macula densa qui correspondent aux cellules impliquées dans le rétrocontrôle tubuloglomérulaire. Ces différences entre souris et humains mènent à deux conclusions, soit les modèles sont très limités et il faut en créer d'autre, soit il faut revoir la caractérisation de la maladie car chacun des types de syndrome de Bartter est différent et il existe aussi des différences entre les mutations et le fond génétique des patients au sein d'un même type de syndrome Bartter, sans oublier l'influence de l'environnement qui aura également des implications sur la sévérité de la maladie.

Un dernier modèle de syndrome de Bartter anténatal est toujours en préparation. En effet, les souris délétées totalement pour le gène *BSND*, codant la barttine, souffrent de



sévère déshydratation et meurent dans les 5 jours après leur naissance. L'équipe de T. Jensch (MDC/FMP, Berlin, Allemagne) tente donc d'élaborer un modèle de souris KO barttine spécifique du néphron. Par ailleurs, il existe un modèle de souris KO barttine spécifique de l'oreille interne où les souris présentent une surdité sans atteinte rénale ni d'altération morphologique cochléaire (Rickheit et al. 2008). Ainsi, cette étude démontre la fonction essentielle des CLC-K dans la préservation de l'audition et révèle le mécanisme menant à la surdité observée chez les patients atteints du syndrome de Bartter de type IV.

À ce jour, il n'existe aucun modèle de syndrome de Bartter classique (CLC-KB et CaSR). Cependant il existe un modèle de souris KO CLC-K1, l'orthologue murin du CLC-KA qui présente environ 90% d'homologie de séquence avec le CLC-KB dont les mutations sont impliquées dans le syndrome de Bartter de type III. Bien qu'aucune mutation affectant le CLC-KA n'ait été associée à une pathologie, l'inactivation, chez la souris, du gène codant pour le CLC-K1 conduit à l'apparition d'un diabète insipide néphrogénique c'est-à-dire une incapacité du rein à concentrer l'urine résultant d'un défaut du gradient de concentration osmotique cortico-papillaire (Akizuki et al. 2001 ; Matsumara et al. 1999). En effet, les souris KO CLC-K1 maintiennent une excrétion d'eau et de sel normale sous des conditions standard mais sont incapables de concentrer leur urine lors de condition de restriction en eau. De plus, ces souris ne présentent pas d'augmentation de l'osmolarité urinaire après une injection d'agoniste de la vasopressine. Ces études indiquent donc que le CLC-K1 est crucial pour le transport transépithélial au niveau de la branche fine ascendante de l'anse de Henle et ainsi la création d'une hypertonicité au niveau de la médulla interne. Cependant, ces souris ne montrent pas de défaut de réabsorption du chlorure qui doit être compensée au niveau de la branche large ascendante de l'anse de Henle. De plus, une étude antérieure montre que les ARNm de rCLC-K1 sont environ 4 fois plus élevés chez des rats privés d'eau pendant 5 jours, ce qui concorde avec le phénotype des souris KO CLC-K1 (Uchida et al. 1993). L'absence de phénotype chez les humains peut s'expliquer par le fait que les souris produisent une urine plus hyperosmotique que les humains. Le nombre de néphrons profonds, c'est-à-dire des néphrons dont l'anse est exceptionnellement longue, est donc beaucoup plus important. La branche fine ascendante de l'anse de Henle a alors une fonction essentielle chez la souris dans la création du gradient de concentration osmotique cortico-papillaire, contrairement à son rôle plus modéré chez l'humain.

### 3.4. Physiopathologie du syndrome de Bartter de type III

Traditionnellement, les mutations du gène *CLCNKB* codant le canal chlorure CLC-KB entraîne un syndrome de Bartter classique (Simon et al. 1997) qui se caractérise par une perte rénale de sel, une polyurie, un hyperaldostéronisme secondaire, une hypokaliémie, une alcalose métabolique, et une pression sanguine normale à basse (Hebert 2003 ; Fahlke et al. 2010). Ce syndrome est généralement diagnostiqué durant l'enfance et se traduit par des retards de croissance, des faiblesses musculaires et une hyper ou normocalciurie (Briet et al. 2006 ; Brochard et al. 2009). Cependant, différents phénotypes allant du syndrome de Bartter anténatal sévère au Gitelman ont été rapportés pour des sujets porteurs de mutations du gène *CLCNKB* (Colussi et al. 2002 ; Jeck et al. 2000 ; Nozu et al. 2007 ; Zelikovic et al. 2003). Toutefois, aucun des patients n'est atteint de surdité, contrairement aux patients avec des mutations du gène *BSND*. Ces données suggèrent donc une voie alternative de réabsorption basolatérale du chlorure qui pourrait compenser l'inactivation du CLC-KB au niveau de l'oreille interne et, de façon plus variable, au niveau du rein. Au moins deux éléments suggèrent que le CLC-KA pourrait contribuer à cette compensation : (1) l'expression du CLC-KA recouvre celle du CLC-KB au niveau des cellules marginales de la strie vasculaire, de la branche large ascendante de l'anse de Henle et des cellules intercalaires du canal collecteur ; (2) un phénotype ressemblant au syndrome de Bartter de type IV a été reporté chez deux enfants présentant une perte de fonction digénique de *CLCNKA* et *CLCNKB* du fait d'une délétion touchant ces deux gènes adjacents sur le chromosome 1p36 (Nozu et al. 2008 ; Schlingmann et al. 2004). D'autre part, il n'existe pas de corrélation entre le type de mutation (large délétion de la protéine / mutation non-sens / mutation faux-sens / erreur d'épissage / décalage du cadre de lecture) et la sévérité clinique des symptômes du Bartter de type III (Colussi et al. 2002 ; Konrad et al. 2000).

Tous les patients atteints d'un syndrome de Bartter de type III, anténatal, classique et mixe Bartter-Gitelman, présentent des concentrations plasmatiques plus faibles en  $K^+$  (**hypokaliémie plus prononcée**), en  $Cl^-$  (**hypochlorémie plus prononcée**) et plus importantes en bicarbonate (**alcalose plus marquée**), comparés aux patients souffrant des autres types de syndrome de Bartter (Brochard et al. 2009). Seuls les patients atteints d'un syndrome de Bartter de type IV (perte de fonction de la barttine) montrent une hypokaliémie plus prononcée, mais les concentrations plasmatiques en  $Cl^-$  et en bicarbonate sont comparables

à celles des patients présentant une perte de fonction de NKCC2 et ROMK. L'hypokaliémie plus prononcée résulterait de l'expression plus large du CLC-KB qui, contrairement à celle de NKCC2 et ROMK, s'étend tout le long des segments terminaux du néphron (branche large ascendante de l'anse de Henle, tubule contourné distal et cellules intercalaires du canal collecteur). De ce fait, l'altération de la réabsorption du NaCl au niveau de la branche large ascendante de l'anse de Henle ne peut être compensée au niveau du tubule contourné distal, comme c'est le cas lors de mutations de NKCC2 et ROMK, d'où une hypokaliémie, originaire du canal collecteur, plus prononcée. L'hypochlorémie plus prononcée a d'abord été expliquée par une perte extra-rénale de chlorure via des vomissements, fréquents chez les enfants atteints d'un syndrome de Bartter. Cependant les enfants ne vomissant pas présentaient également cette hypochlorémie plus prononcée (Brochard et al. 2009). Elle s'expliquerait donc plutôt par une incapacité du rein à s'adapter à la diminution de réabsorption de chlorure au niveau du canal collecteur, le CLC-KB s'exprimant au sein des cellules intercalaires du canal collecteur qui constituent la principale, voire l'unique, voie de réabsorption du chlorure. Enfin, l'alcalose plus marquée serait la conséquence du défaut de réabsorption du  $\text{Cl}^-$  au sein des cellules intercalaires  $\beta$ . En effet, d'après des données non-publiées de notre équipe, il semblerait que les cellules intercalaires  $\beta$  expriment uniquement le CLC-KB, tandis que les cellules intercalaires  $\alpha$  exprimeraient à la fois le CLC-KB et le CLC-KA. Or, les cellules intercalaires  $\beta$  sont impliquées dans la sécrétion de bicarbonate. Ainsi, un défaut du CLC-KB va entraîner une diminution de la sécrétion de bicarbonate à travers la pendrine et donc une alcalose plus marquée. Cependant, une question reste en suspens. Pourquoi, dans le cas d'une perte de fonction de la barttine, ne décrit-on pas une hypochlorémie plus prononcée et une alcalose plus marquée? Une possible explication serait qu'une perte de fonction de la barttine n'entraînerait pas une perte totale de fonction du CLC-KB et du CLC-KA qui réabsorberaient toujours un peu de chlorure, tandis qu'une perte de fonction du CLC-KB entraînerait une absence totale de réabsorption de chlorure au niveau des cellules initiales du tubule contourné distal et des cellules intercalaires  $\beta$ , où seul CLC-KB s'exprime (données non publiées du laboratoire ; Nissant et al. 2004). L'expression significative de CLC-KB à la membrane plasmique en absence de barttine est en faveur de cette hypothèse (Scholl et al. 2006). Cependant, des expériences de mutagenèse vont à l'encontre de cette même hypothèse car elles semblent montrer que la barttine est essentielle à la fonction du CLC-KB (Scholl et al. 2006).

Comme nous l'avons mentionné précédemment, Il existe une véritable hétérogénéité phénotypique induite par les mutations du gène *CLCNKB*, il n'existe donc pas de corrélation génotype-phénotype chez les patients atteints d'un syndrome de Bartter de type III. Nous nous contenterons donc seulement de dresser un tableau des différentes mutations du CLC-KB rapportées dans la littérature jusqu'à nos jours [voir Tableau 3]. Les premières d'entre-elles furent rapportées en 1997 et étaient diverses (larges délétion, mutations non-sens, mutations faux-sens, erreur d'épissage), toutes entraînant un syndrome de Bartter classique (Simon et al. 1997). Parmi ces mutations, certaines étaient à l'état homozygote et d'autres à l'état hétérozygote composite. Une seconde étude ajouta ensuite seize nouvelles mutations à celles précédemment décrites (Konrad et al. 2000). Les phénotypes des patients montraient une variabilité, certains présentaient une histoire de polyhydramnios, des épisodes sévères de déplétion volémique et une sévère hypokaliémie durant la période néonatale, tandis que d'autres étaient presque asymptomatiques. La même année, trois patients présentant un syndrome mixte Bartter-Gitelman (déplétion volémique, retard de développement, hyperprostaglandinurie, mais ensuite développement d'une hypomagnésémie et d'une hypocalciurie) ont été décrits (Jeck et al. 2000). De façon similaire, douze individus d'une même famille, tous porteurs d'une mutation homozygote identique, ne présentaient aucun des traits cliniques ou biochimiques permettant de distinguer syndrome de Bartter classique et syndrome de Gitelman (mixte Bartter-Gitelman) (Zelikovic et al. 2003). A l'opposé, un patient fut rapporté comme présentant une néphrolithiase, ce qui n'a encore jamais été décrit dans un syndrome de Bartter de type III (Colussi et al. 2002). Un autre cas, extraordinairement rare, a été consigné de syndrome de Bartter classique avec une insuffisance rénale chronique (Lin et al. 2009). En 2004, l'observation particulièrement intéressante d'un patient, issu d'une famille consanguine, présentant une large délétion homozygote du CLC-KB et une mutation homozygote de CLC-KA fut rapportée (Schlingmann et al. 2004). Ce patient présente tous les symptômes d'un syndrome de Bartter de type IV mais aucune mutation de la barttine. Il faudra attendre l'année 2007 pour décrire un nouveau cas de syndrome de Bartter de type IV sans mutation de la barttine chez une patiente, issu d'une famille non-consanguine, qui présente un allèle avec une large délétion d'environ 12kb s'étendant de *CLCNKA* à *CLCNKB* et un allèle avec une mutation non-sens de CLC-KA et une mutation d'un site d'épissage de CLC-KB (Nozu et al. 2008). Ce cas supporte donc l'existence de maladies héréditaires digéniques en dehors de la

portée des maladies mendéliennes/monogéniques. Enfin, de nombreuses autres mutations du canal chlorure CLC-KB ont été rapportées ces dix dernières années et une méthode a été développée afin de plus facilement détecter les larges délétions permettant d'éclaircir le génotype des patients montrant une unique mutation ponctuelle hétérozygote (Bettinelli et al. 2005 ; Nozu et al. 2007 ; Tajima et al. 2006 ; Urbanova et al. 2011 ; Yu et al. 2010).

Mutations décrites	Phénotypes associés	Source
Larges délétions de <i>CLCNKB</i> , P124L, A204T, S323épissage, A349D, Y432H, R438C, Q513X	Bartter classique	Simon et al. 1997
A77T, A77épissage, P124L, L139P, N193délétion de 178pb, E261épissage, G289épissage, S297R, S337F, H357Q, R438H, P463délétion de 11pb, S518insertion de 4pb, R538P, K560M, S573Y, P630insertion de 4pb	Bartter anténatal, classique et mixe Bartter-Gitelman	Konrad et al. 2000
Larges délétions de <i>CLCNKB</i> , adénine changée en guanine au niveau du site consensus d'épissage de l'intron 7	Mixe Bartter-Gitelman	Jeck et al. 2000
Large délétion de <i>CLCNKB</i>	Bartter classique avec néphrolithiase	Colussi et al. 2002
R438H	Mixe Bartter-Gitelman	Zelikovic et al. 2003
Large délétion homozygote de <i>CLCNKB</i> et mutation homozygote W80C de <i>CLCNKA</i>	Bartter anténatal avec surdité	Schlingmann et al. 2004
A61D, V149E	Bartter classique	Bettinelli et al. 2005
Larges délétions de <i>CLCNKB</i> , $\Delta$ L130, W610X	Bartter classique	Tajima et al. 2006
Larges délétions de <i>CLCNKB</i> , délétion de 2pb au sein de l'acide aminé A445, W610X	Bartter classique	Nozu et al. 2007
Un allèle avec large délétion ~12kb de <i>CLCNKA</i> et <i>CLCNKB</i> + un allèle Q260X- <i>CLCNKA</i> et guanine changée en adénine au niveau du site consensus d'épissage de l'intron 17	Bartter anténatal avec surdité	Nozu et al. 2008
Larges délétions de <i>CLCNKB</i> , T115P, S518insertion de 4pb	Bartter anténatal	Brochard et al. 2009
G470E	Bartter classique avec insuffisance rénale chronique	Lin et al. 2009
R351W, R30X, A210V	Bartter classique	Yu et al. 2010
R76X, R438C, Q303P, délétion de 1pb au sein de l'acide aminé A432	Bartter classique	Urbanova et al. 2011

**Tableau 3 :** différentes mutations du gène *CLCNKB* rapportées dans la littérature.

## 4. Objectifs du travail de thèse

Le manque de connaissances sur la physiologie du CLC-KB est un facteur déterminant pour l'appréhension du syndrome de Bartter de type III et la prise en charge des patients. Devant la diversité des phénotypes observés chez les patients et les nombreuses mutations décrites sur le gène *CLCNKB*, il est nécessaire de procéder à une analyse fonctionnelle des mutations pour tenter d'apporter des pistes d'exploration thérapeutique et d'approfondir davantage les mécanismes de régulation, de conduction et de « gating ». Il est très instructif d'analyser les mutations pathogènes du CLC-KB afin de déterminer l'origine du défaut: absence de synthèse, défaut d'adressage, problème de conduction, dysfonctionnement de la régulation. Ces études permettent d'orienter les recherches pour une restauration éventuelle de la fonction. C'est particulièrement vrai dans le cas d'un défaut d'adressage qui peut-être corrigé sur des modèles cellulaires par l'utilisation de composés non-spécifiques (tel que le glycérol dans le cas du CFTR  $\Delta F508$ , Gelman et al. 2002) ou spécifiques (tels que les antagonistes du récepteur de la vasopressine dans le traitement du diabète insipide néphrogénique, Bernier et al. 2006).

Il n'existe que peu d'analyses ayant procédé à ces analyses fonctionnelles (Martinez et al. 2008 ; Yu et al. 2010). Le but de ce travail de thèse a donc été d'explorer fonctionnellement de nouvelles mutations ponctuelles, décrites pour la première fois à travers ce manuscrit, touchant la protéine CLC-KB et entraînant des syndromes de Bartter et Gitelman. Nous avons sélectionné ces mutations pathogènes en nous appuyant, d'une part, sur la cristallographie des CLC bactériens et eucaryotes afin d'identifier les zones ayant une signification fonctionnelle potentielle (site de sélectivité au chlorure, interface entre les deux monomères, site de liaison d'une kinase, domaines CBS) et, d'autre part, sur les séquences des CLC-K d'autres espèces et des CLC de mammifère dans le but de déterminer les acides aminés hautement conservés.

Ce travail a fait l'objet de deux soumissions d'articles: « *CLCNKB mutations causing Bartter-Gitelman syndrome affect channel surface expression.* » et « *Reduced surface expression and blunted pH-dependent gating of CLC-Kb chloride channel in mild Bartter syndrome caused by CLCNKB mutation within the selectivity filter.* ».

# MÉTHODES

## 1. Biologie moléculaire

### 1.1. ADNc et vecteurs d'expression

Les séquences codantes du CLC-KB et de la barttine ont été clonées, respectivement, dans les vecteurs pTLN et pT7T3 qui sont optimisés pour l'expression protéique dans les ovocytes de xénope et qui nous ont été gracieusement fournies par le Pr. T.J. Jentsch (FMP, MDC, Berlin, Allemagne) [voir Figure 15A]. La transcription du CLC-KB est sous le contrôle du promoteur SP6, tandis que celle de la barttine est régie par le promoteur T7. Ces plasmides contiennent chacun un gène de résistance à l'ampicilline et le gène de la  $\beta$ -globine de xénope qui apporte une plus grande stabilité aux ARN messager ainsi qu'une efficacité de traduction accrue.

Les séquences codantes du CLC-KB et de la barttine ont également été clonées dans le plasmide bicistronique pVitro2 qui est optimisé pour l'expression au sein des cellules de mammifères [voir Figure 15B], ainsi que dans les plasmides pRc-CMV-IRES-CD8 (CLC-KB) et pIRES2-EGFP (barttine) respectivement.

Un épitope FLAG (séquence: DYKDDDDK) a été inséré au niveau de la boucle extracellulaire située entre les hélices L et M du CLC-KB, selon la structure cristallographique de ecCLC-1. Nous avons préalablement vérifié que cette épitope n'altérerait pas l'activité du canal sauvage.

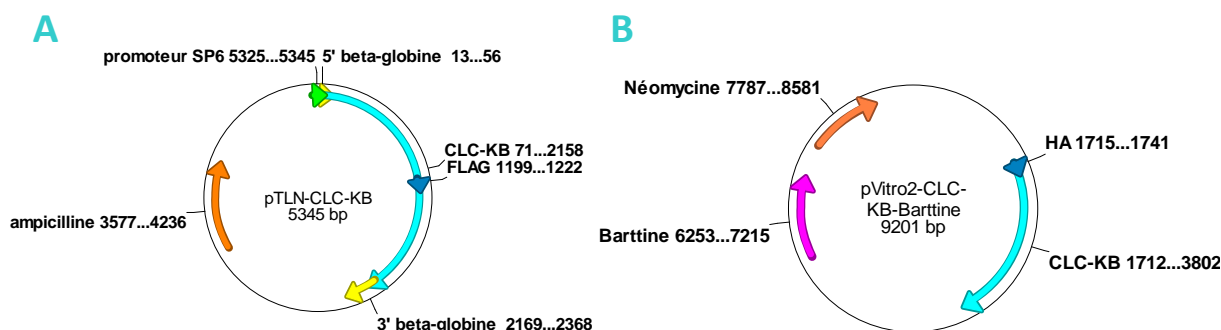


Figure 15: cartes des plasmides pTLN contenant CLC-KB FLAG et pVitro2 contenant CLC-KB et Barttine.

## 1.2. Mutagenèse dirigée

Les mutations ponctuelles du CLC-KB, mises à notre disposition par les docteurs Rosa Vargas-Poussou et Anne Blanchard de l'Hôpital Européen Georges Pompidou, ont été introduites par mutagenèse dirigée à l'aide du kit QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, La Jolla, Californie, USA). Cette technique consiste à produire un brin d'ADN plasmidique muté à l'aide d'un oligonucléotide synthétique, complémentaire d'un des deux brins du plasmide, contenant la mutation désirée. L'oligonucléotide va s'hybrider, puis être allongé avec une très haute fidélité par l'ADN polymérase PfuTurbo. Le produit de PCR obtenu est ensuite digéré par l'enzyme de restriction DpnI qui reconnaît spécifiquement l'ADN méthylé et hémi-méthylé, l'ADN parental non porteur de la mutation est ainsi digéré.

## 1.3. Transformation des bactéries compétentes

Une fois la digestion par l'enzyme DpnI réalisée, des bactéries *E. coli* thermocompétentes XL10 Gold sont transformées avec les plasmides mutés. Dans un premier temps, une sélection sur milieu solide LB agar contenant soit de l'ampicilline (50µg/mL), soit de la kanamycine (25µg/mL) est réalisée durant toute la nuit à 37°C. Les clones d'intérêts sont ensuite repiqués dans un milieu LB liquide, en présence de l'antibiotique de sélection, et mis en culture à 37°C pendant 12 à 16 heures avec agitation.

## 1.4. Purification des plasmides

L'extraction des plasmides est réalisée à l'aide du kit GeneJET Plasmid Miniprep (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada). Le principe de cette technique repose sur une lyse alcaline des bactéries, suivie d'une purification de l'ADN plasmidique sur une colonne de silice, se terminant par l'élution des plasmides. Une fois purifiés, les plasmides sont séquencés afin de confirmer la présence de la mutation d'intérêt et d'exclure toutes mutations additionnelles.

## 1.5. Transcription *in vitro*

Les plasmides pTLN et pT7T3, contenant respectivement le CLC-KB et la barttine et étant optimisés pour l'expression dans les ovocytes de xénope, sont linéarisés par digestion



enzymatique grâce aux enzymes de restriction MluI et NotI. Puis, ils sont transcrits en ARNm à l'aide des kits SP6 et T7 mMessage mMachine (Ambion, Austin, Texas, USA). Les ARNm néo-synthétisés sont ensuite précipités au chlorure de lithium, sont repris dans de l'eau sans RNase et sont conservés à -80°C.

## 2. Méthodes liées à l'expression hétérologue au sein d'ovocytes de *Xenopus laevis*

Ce travail a nécessité l'emploi de trois systèmes d'expression hétérologue : les ovocytes de *Xenopus laevis* et les cellules rénales HEK293 et MDCK.

Les ovocytes de xénope offrent l'avantage d'être facilement disponibles, puisque le *Xenopus laevis* fournit un grand nombre d'ovocytes par ponte (1000 à 6000 ovocytes/ponte). Ils offrent également un niveau d'expression protéique suffisant de canaux et de transporteurs qui est facilement modulable grâce au contrôle de la quantité d'ARNm injecté et de la durée d'incubation des ovocytes injectés. De plus, les ovocytes de xénope sont utilisés à leur stade mature lorsqu'ils mesurent 1,2 à 1,3 mm de diamètre, ce qui rend leur manipulation aisée. Enfin, leurs conditions de conservation avant et après injection sont beaucoup moins contraignantes que celles des cellules de mammifère. En effet, ils peuvent être conservés à 16°C dans une solution Barth [voir Tableau 4] à pH7,4 contenant de la gentamycine (20 mg/L) durant une dizaine de jours sans nécessiter de repiquage systématique. Les ovocytes que nous avons utilisés ont été fournis par Ecocyte Bioscience (Castrop-Rauxel, Allemagne).

### 2.1. Injection

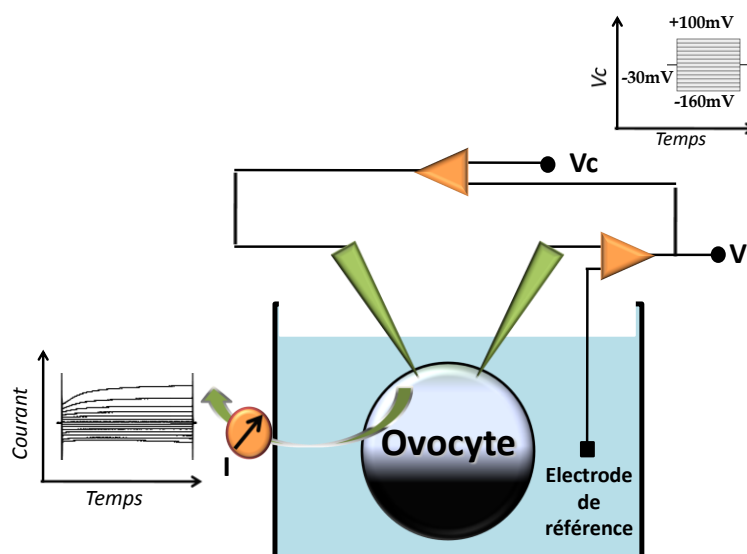
Chaque ovocyte est immobilisé au fond d'une boîte de Pétri, contenant la solution de Barth à pH7,4 supplémentée en gentamycine, et est injecté sous loupe binoculaire avec les ARNm d'intérêts. Les pipettes d'injection (Drummond Scientific Company, Broomall, Pennsylvanie, USA) sont étirées par une pipette Puller verticale modèle 720 (David Kopf Instruments, Tujunga, Californie, USA). Elles sont reliées à un injecteur à pression d'air (Inject+Matic, Genève, Suisse) réglé pour injecter 50nL de solution par ovocyte. Dans notre étude, 10ng d'ARNm CLC-KB, sauvage ou muté, et 5ng d'ARNm barttine sont injectés par ovocyte. Les ovocytes sont conservés, toujours dans une solution de Barth à pH7,4

supplémentée en gentamycine, pendant 48 à 72 heures à 16°C afin de permettre une bonne expression protéique et l'adressage des sous-unités à la membrane plasmique.

## 2.2. Voltage-clamp en double microélectrodes

La technique de voltage-clamp en double microélectrodes est une approche simple et couramment utilisée pour étudier les propriétés biophysiques des canaux. Cette technique présente toutefois deux limites importantes. D'une part, la présence de courants chlorure endogènes rend l'interprétation des courants enregistrés pour les mutants inactivateurs délicate. Faute d'existence d'inhibiteur spécifique du CLC-KB, nous avons utilisé l'iodure, qui bloque le canal CLC-KB mais qui est très fortement conduit par les canaux chlorure endogènes de l'ovocyte (en particulier aux voltages les plus positifs), afin de différencier les courants attribuables à ces deux types de canaux. Nous avons également utilisé une solution acide pH5.0 afin de bloquer complètement les courants CLC-KB et ainsi pouvoir isoler les courants CLC-KB des courants endogènes. Cette approche n'est pas non plus totalement satisfaisante car le pH acide active parfois un courant endogène aux potentiels les plus négatifs. D'autre part, les résultats varient de façon importante en fonction du lot d'ovocyte, les enregistrements ont donc été réalisés avec 3 lots différents d'ovocytes.

La technique consiste à introduire deux microélectrodes à l'intérieur d'un ovocyte, préalablement injecté, placé dans une chambre de perfusion contenant une solution physiologique ND96 [voir Tableau 4]. L'une des microélectrodes est connectée à un circuit électronique permettant de mesurer le potentiel de membrane (V) [voir Figure 16]. Un amplificateur mesure la moindre différence entre ce potentiel et un potentiel de commande ( $V_c$ ) dont la valeur est fixée par l'expérimentateur [voir Figure 16]. La sortie de cet amplificateur est reliée à la seconde microélectrode. Le courant mesuré représente le courant global (I) générés en réponse aux voltages imposés [voir Figure 16]. Le protocole de voltage-clamp utilisé impose à la membrane de l'ovocyte une série de créneaux de voltages de -160 à +100mV par paliers de 20 mV, durant 800msec chacun, à partir d'un potentiel de maintien de -30mV.



**Figure 16 :** schéma du dispositif de voltage-clamp en double microélectrodes. Un système électronique permet le maintien d'un potentiel de commande ( $V_c$ ) à une valeur fixe pendant une durée déterminée. Une microélectrode mesure le potentiel de membrane ( $V$ ), tandis qu'une seconde, reliée au système électronique, recueille le courant global généré ( $I$ ), enfin une électrode de référence ferme le circuit appliqué à l'ovocyte de xénope.

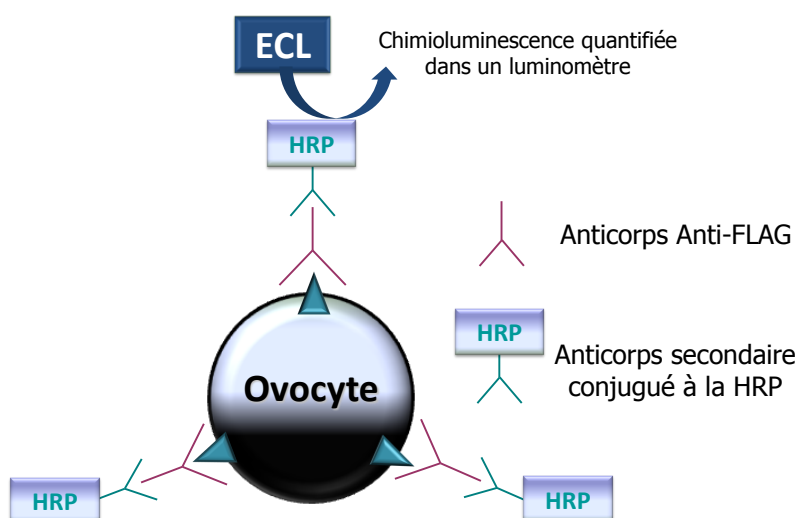
Les microélectrodes sont préparées à partir de tubes capillaires de borosilicate (Harvard Apparatus, Edenbridge, Kent, UK), sont étirées par une micropipette Puller horizontale modèle P97 (Sutter Instrument Company, Novato, Californie, USA) et sont remplies d'une solution conductrice de KCl 3M. Leur résistance est comprise entre 0,1 et 1 M $\Omega$ . Les microélectrodes sont reliées à un amplificateur TEC-10CX (npi electronic GmbH, Tamm, Allemagne) par l'intermédiaire de fils d'argent chlorurés. Cet amplificateur est lui-même relié à une interface analogique-numérique Digidata 1320A (Axon Instruments, Union City, Californie, USA) permettant de visualiser les signaux provenant de l'amplificateur sur un écran d'ordinateur. Ces signaux sont ensuite analysés grâce au logiciel pCLAMP 10.0 (Axon Instruments, Union City, Californie, USA).

La chambre de perfusion est déposée sur une table antivibratoire sur laquelle repose la cage de Faraday. Ces deux éléments garantissent la protection mécanique et électrique de la préparation. La table antivibratoire amortit les vibrations mécaniques qui pourraient perturber l'enregistrement et/ou briser les microélectrodes sur l'ovocyte. La cage de Faraday, quant à elle, isole électriquement la préparation de toute perturbation induite par les appareils électriques environnant nécessaires à l'enregistrement et placés en dehors de la cage.

### 2.3. Luminescence

La technique de voltage-clamp en double microélectrodes ne permet pas d'expliquer la perte ou le gain de fonction du canal CLC-KB. Elle doit donc être complétée par d'autres approches expérimentales telles que la luminescence qui est une technique permettant de déterminer le niveau d'expression d'une protéine d'intérêt à la membrane plasmique grâce à un anticorps spécifique de cette protéine ou une étiquette extracellulaire [voir Figure 17].

Les ovocytes, préalablement injectés, sont placés dans une solution de ND96 supplémentée par 1% de BSA. Ils sont ensuite incubés durant 1h en présence de l'anticorps primaire dilué dans une solution de ND96-1%BSA (2.5µg/mL, anticorps monoclonal de souris anti-FLAG, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Après 6 rinçages dans du ND96-1%BSA, les ovocytes sont incubés durant 1h en présence de l'anticorps secondaire, couplé à la peroxydase, dilué dans du ND96-1%BSA (1µg/mL, anticorps de chèvre anti-souris couplé à la HRP, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Californie, USA). Ils sont ensuite lavés 6 fois dans du ND96-1%BSA, puis 8 fois dans du ND96. Chaque ovocyte est finalement plongé dans 50µL d'une solution *SuperSignal ELISA Femto* (Pierce, Rockford, Illinois, USA) à température ambiante puis est placé dans un luminomètre Turner TD-20/20 (Turner design, Sunnyvale, Californie, USA). L'émission de lumière est rendue en unité relative de luminescence (URL) après un temps d'acquisition de 10 secondes.



**Figure 17 :** principe général de la luminescence. Les anticorps primaires se fixent au site antigénique de la protéine d'intérêt (ici l'étiquette FLAG portée par CLC-KB), puis ce sont les anticorps secondaires qui sont dirigés contre les anticorps primaires. Les anticorps secondaires sont couplés à la HRP qui, lorsqu'elle entre en contact avec son substrat contenu dans l'ECL, produit de la lumière pouvant être quantifiée à l'aide d'un luminomètre.

### 3. Méthodes liées à l'expression hétérologue au sein des lignées rénales HEK293 et MDCK

La lignée cellulaire rénale humaine HEK293 (pour ***H**uman **E**mbryonic **K**idney 293*) a été décrite en 1977 par Graham et collaborateurs (Graham et al. 1977). Un important variant de ces cellules est la lignée HEK293T qui contient le large antigène T du virus SV40 permettant la réplication épisomale des plasmides transfectés contenant l'origine de réplication SV40. Ce variant présente donc l'avantage d'offrir un important niveau d'expression de l'ADNc transfecté.

La lignée cellulaire rénale canine MDCK (pour ***M**adin-**D**arby **C**anine **K**idney*) a, quant à elle, été dérivée en 1958 par Madin et Darby.

#### 3.1. Culture et transfection

Les lignées cellulaires rénales HEK293 et MDCK ont été cultivées à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> dans un *Dulbecco's modified Eagle's medium* (Invitrogen, Grand Island, New-York, USA) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (Invitrogen, Grand Island, New-York, USA), 100unités/mL de pénicilline et 100µg/mL de streptomycine (Invitrogen, Grand Island, New-York, USA). Les transfections transitoires ont été réalisées par électroporation selon les recommandations du fabricant (Nucleofector, Lonza, Basel, Suisse).

#### 3.2. Enregistrements en cellule entière (HEK293)

20 heures après leur transfection, les cellules HEK293, cultivées dans des boîtes de Petri de 35mm de diamètre, sont baignées dans une solution à pH7,4 dont la composition est détaillée dans le Tableau 4 et sont observées sous un microscope inversé à fluorescence. Les cellules candidates à un enregistrement en cellule entière sont détectées grâce à, d'une part, la fluorescence qui révèle les cellules transfectées avec la barttine (pIRES2-EGFP) et, d'autre part, des billes couplées à un antigène anti-CD8 (Dynabeads CD8, Invitrogen, Grand Island, New-York, USA) qui indiquent les cellules exprimant le CLC-KB (pRc-CMV-IRES-CD8)

Contrairement au voltage-clamp en double microélectrodes, cette technique consiste à approcher une seule et unique microélectrode à la surface d'une cellule, puis de «sceller» cette électrode sur la membrane plasmique en imposant une dépression à l'intérieur du capillaire de verre par l'intermédiaire d'un cathéter relié à une prise d'air, enfin d'exercer

une forte aspiration afin que la solution de la microélectrode entre en contact avec le milieu intracellulaire [voir Figure 18]. Dans cette condition, la microélectrode enregistre le courant traversant la surface membranaire totale, on ne distingue pas les canaux individuels. Le protocole de patch-clamp utilisé impose à la membrane de l'ovocyte une série de créneaux de voltages de -170 à +90mV par paliers de 20 mV, durant 200msec chacun, à partir d'un potentiel de maintien de 0mV.



Figure 18 : configuration appelée « enregistrement en cellule entière » (d'après Teulon 2004).

La microélectrode est préparée à partir de tubes capillaires de borosilicate (Harvard Apparatus, Edenbridge, Kent, UK), étirée par une micropipette Puller horizontale modèle P97 (Sutter Instrument Company, Novato, Californie, USA) et est remplie d'une solution à pH7,4 dont la composition est détaillée dans le Tableau 4. Sa résistance est comprise entre 2 et 3 MΩ. La microélectrode est reliée à un amplificateur TEC-10CX (npi electronic GmbH, Tamm, Allemagne) par l'intermédiaire d'un fil d'argent chlorurés. Cet amplificateur est lui-même relié à une interface analogique-numérique Axopatch 200B (Axon Instruments, Union City, Californie, USA) permettant de visualiser les signaux provenant de l'amplificateur sur un écran d'ordinateur. Ces signaux sont ensuite analysés grâce au logiciel pCLAMP 10.0 (Axon Instruments, Union City, Californie, USA).

Enfin, comme pour le voltage-clamp en double microélectrodes, l'ensemble des éléments est déposée sur une table antivibratoire sur laquelle repose la cage de Faraday.

### 3.3. Immunofluorescence (MDCK)

Les cellules MDCK, transfectées entre 24 et 48 heures avant l'expérience, sont mises en culture dans des boîtes contenant des puits de 33 mm de diamètre au fond desquels sont disposées des lamelles de verre de 1 cm de côtés. Les cellules, placées à température ambiante, sont tout d'abord rincées à l'aide de PBS (Invitrogen, Grand Island, New-York,

USA). Puis, elles sont fixées avec 3% de formaldéhyde durant 15 minutes. Elles sont ensuite rincées quatre fois au PBS, puis perméabilisées pendant 15 minutes avec 0,075% de saponine. Les sites de fixation non-spécifiques potentiels des anticorps sont bloqués grâce à 1% de BSA durant 45 minutes. Les cellules sont mises en contact avec l'anticorps primaire anti-FLAG (anticorps monoclonal de souris anti-FLAG, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) dilué dans du PBS-0,075%saponine-0,1%BSA à raison de 1/500<sup>ème</sup> pendant 1 heure. Les cellules sont alors rincées quatre fois au PBS et placées en contact avec l'anticorps secondaire anti-souris couplé à un fluorochrome (IgG de chèvre anti-IgG de souris couplé à un fluorochrome Alexa 488, Invitrogen, Grand Island, New-York, USA) dilué dans du PBS-0,075%saponine-0,1%BSA à raison de 1/1000<sup>ème</sup> pendant 1 heure. Finalement, les cellules sont rincées six fois au PBS. À la fin de ces différentes étapes, la lamelle supportant les cellules est retournée sur une lame de verre recouverte de milieu de montage contenant du DAPI (Vectashield HardSet Mounting Medium with DAPI, Vector Laboratories, Burlingame, Californie, USA). Les lames sont observées en microscopie confocale (Zeiss LSM 710).

## 4. Statistiques

Les résultats sont exprimés selon leur moyenne  $\pm$  SEM et ont été analysés statistiquement par une ANOVA suivie d'un test de Holm-Sidak à l'aide du logiciel SigmaStat ( $p < 0,05$  est considéré comme significatif).

Nom de la solution	Composition de la solution					
Barth	88mM NaCl	1mM KCl	0,4mM CaCl <sub>2</sub>	0,3mM Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,8mM MgSO <sub>4</sub>	10mM Hepes
ND96	96mM NaCl	2mM KCl	1,5mM CaCl <sub>2</sub>	1mM MgCl <sub>2</sub>	5mM Hepes	
Bain HEK293	140mM NaCl	2mM CaCl <sub>2</sub>	1mM MgCl <sub>2</sub>	22mM sucrose	10mM Hepes	
Microélectrode HEK293	100mM sodium gluconate	33mM CsCl	1mM MgCl <sub>2</sub>	2mM EGTA	1mM Na <sub>3</sub> ATP	10mM Hepes

Tableau 4 : composition des différentes solutions.

## RÉSULTATS

### 1. Première publication: *CLCNKB* mutations causing Bartter-Gitelman syndrome affect channel surface expression

#### 1.1. Résumé

Cette partie de mon projet de thèse a consisté en l'étude de sept mutations pathogènes du CLC-KB, dont cinq jamais publiées (L81P, G246R, R351P, G424E et L439P). Parmi ces sept mutations, on trouve quatre mutations faux-sens homozygotes (L81P, G246R, G424E et R438H) et trois mutations faux-sens hétérozygotes composites (R351P/L439P et R92W détectée à l'état homozygote accompagnée d'une large délétion à l'état hétérozygote). Ces mutations ont été isolées par les docteurs Rosa Vargas-Poussou et Anne Blanchard (Département de génétique, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris). Nous nous sommes attachés à décrire ces nouveaux mutants d'un point de vue fonctionnel mais aussi clinique. Toutes les mutations ont été testées par expression hétérologue dans les ovocytes de xénope et les cellules rénales HEK293 qui ont permis de déterminer le courant et l'adressage membranaire des protéines.

Dans un premier temps, les données cliniques des patients portant les mutations décrites dans cette étude ont montré une importante hétérogénéité. En effet, trois patients ont été diagnostiqués comme atteints d'un syndrome de Bartter avant l'âge de 1 an (dont un montrant une histoire de consanguinité familiale), deux patients ont été identifiés plus tardivement (13 et 28 ans), enfin deux patients ont été décrits comme atteints d'un syndrome de Gitelman (diagnostic tardif, hypomagnésémie et hypocalciurie).

Les courants portés par les différents mutants ont ensuite été analysés dans l'ovocyte de xénope. Cette première série d'expériences a démontré que seule trois mutations, L81P, R92W et R351P, laissent subsister un courant résiduel diminué (30 à 60%) par rapport au CLC-KB sauvage. En revanche, les quatre autres mutations (G246R, G424E, R438H et L439P) ne laissent subsister aucune activité électrique : le niveau de production de courant n'est pas significativement différent de celui produit par les ovocytes non injectés. Ces résultats ont été confirmés en utilisant un autre modèle cellulaire, les cellules rénales HEK293, en



enregistrement en cellule entière. Nous avons ensuite analysé dans des ovocytes de xénope la sensibilité au calcium et pH extracellulaires des trois mutants montrant un courant résiduel. Par rapport au CLC-KB sauvage, aucun d'entre eux ne présente de sensibilité altérée.

Nous avons alors cherché à déterminer l'expression à la membrane plasmique des canaux mutés dans des ovocytes de xénope. À l'aide de la technique de luminescence, nous avons démontré que les trois mutants montrant un courant résiduel présentent une diminution d'expression à la membrane plasmique proportionnelle à la diminution de leur conductance. De façon similaire, les quatre mutants ne montrant aucun courant ne sont pas exprimés à la membrane plasmique.

En conclusion, cette étude de mutations pathogènes du CLC-KB suggère qu'une altération de l'expression à la membrane plasmique semble être le défaut fonctionnel majeur induit par ces mutations. Cette observation contraste avec les études fonctionnelles de mutations du CLC-1 et du CLC-5 (Pusch et al. 1995 ; Lossin et al. 2008 ; Lourdel et al. 2012). Trois mutants conservent une certaine fonctionnalité (30 à 60% de courant comparé au canal sauvage). Une stratégie de restauration pour ces canaux mutés pourrait être l'utilisation de chaperonnes ou encore d'activateurs du CLC-KB, même si pour l'instant seul un activateur du CLC-KA ait été décrit (Liantonio et al. 2006 ; Piccolo et al. 2007).

## 1.2. Article

### ***CLCNKB* mutations causing Bartter syndrome affect channel surface expression**

Mathilde Keck<sup>1,2</sup>, Olga Andrini<sup>1,2</sup>, Johanna Burgos<sup>3</sup>, Olivier Lahuna<sup>1,2</sup>, L. Pablo Cid<sup>3</sup>, Francisco V. Sepúlveda<sup>3</sup>, Rosa Vargas-Poussou<sup>4,6</sup>, Anne Blanchard<sup>5,6</sup>, Stéphane Lourdel<sup>1,2</sup> and Jacques Teulon<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>UPMC Université Paris 06, UMR\_S 872, Laboratoire de génomique, physiologie et physiopathologie rénales, F-75005, Paris, France. <sup>2</sup>INSERM, UMR\_S 872, Laboratoire de génomique, physiologie et physiopathologie rénales, F-75005, Paris, France. <sup>3</sup>Centro de Estudios Científicos, Avenida Arturo Prat 514, Valdivia 509-9100, Chile; <sup>4</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, département de génétique F-75908, Paris, France; <sup>5</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Centre d'Investigation Clinique, F-75908, Paris, France ; <sup>6</sup>Université Paris-Descartes, Faculté de Médecine, F-75006, Paris, France.

**Running head:** CIC-Kb function in Bartter syndrome

#### **Address for correspondence:**

Jacques Teulon, UMR\_S 872, team 3, 15 rue de l'Ecole de Médecine, 75720 Paris Cedex 06, France; phone: 33.1.55.42.78.64; fax: 33.1.46.33.41.72; E-mail: jacques.teulon@upmc.fr

#### **Sources of financial support:**

This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR) [ANR07-PHYSIO-008-2 and BLAN 2010-111201]. We also acknowledge support by ECOS-sud [project C10S03] and Bayerisch-Französisches Hoschschulentrum [project FK34-7]. S. L'Hoste and O. Andrini hold ANR postdoctoral fellowships, and M. Keck and T. Grand PhD fellowships from the French Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche. The Centro de Estudios Científicos is funded by the Centers of Excellence Base Financing Program of Conicyt.

## ABSTRACT

Mutations in the *CLCNKB* gene encoding the ClC-Kb Cl<sup>-</sup> channel cause Bartter syndrome, which is a salt-losing renal tubulopathy characterized by hypokalaemic metabolic alkalosis and secondary hyperaldosteronism. Here, we investigate the functional consequences of 5 novel and 2 published ClC-Kb mutations. When expressed in *Xenopus laevis* oocytes, four mutants carried no current (G246R, G424E, R438H and L439P), whereas one displayed a considerable (60%; L81P), and another two a moderate (30%; R92W, R351P) reduction in conductance as compared to wild-type (WT) ClC-Kb. Stimulation by external Ca<sup>2+</sup> and inhibition by external H<sup>+</sup>, two characteristic properties of the ClC-Kb channel, were not modified in the three mutants displaying residual activity. Surface expression of WT and mutant ClC-Kb was investigated using a chemiluminescence assay on FLAG-tagged ClC-Kb. All the mutations reduced membrane targeting, with a profile similar to that observed for currents. Recorded in HEK293 transfected cells, the currents in the mutants had similar profiles to those obtained in oocytes. Overall, our results show that reduced surface expression is the main functional consequence of these mutations, which are located in diverse parts of the protein ( $\alpha$ -helices B, C, I, N; K-L and M-N linkers).

## INTRODUCTION

Bartter syndrome (BS) is an autosomal recessive renal disorder, characterized by renal salt loss, hypokalaemic metabolic alkalosis, and secondary hyperaldosteronism with normal to low blood pressure. Five types of genetic variants of BS have been identified if we include those related to mutations in the  $\text{Ca}^{2+}$  receptor gene (1). Neonatal types 1 and 2 are caused by mutations leading to loss of function of the  $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$  cotransporter encoded by the *SLC12A1* gene (2, 3) and the inwardly rectifying  $\text{K}^+$  channel Kir1.1 encoded by the *KCNJ1* gene (4) respectively. Type 3 is due to loss of function of the  $\text{ClC-Kb}$   $\text{Cl}^-$  channel encoded by the *CLCNKB* gene (5, 6). Several authors have reported that the clinical features of type 3 BS may, in some cases, be those of Gitelman syndrome (7, 8). This latter syndrome is a less severe salt-depleting tubulopathy characterized by hypokalaemic metabolic alkalosis, hypomagnesemia, and hypocalciuria. Finally, type 4a is due to mutations in the *BSND* gene encoding the protein Barttin, a  $\text{ClC-K}$  regulatory subunit (9), and type 4b is a digenic disease due to loss of function mutations of the genes encoding both chloride channels *CLCNKA* and *CLCNKB* (10); type 4 BS is associated with deafness and frequently has an antenatal presentation. Several studies have investigated the role of Barttin in health and in disease. It appears that Barttin is necessary for targeting  $\text{ClC-Kb}$  and  $\text{ClC-Ka}$  to the plasma membrane (11-14), a function that is altered in disease caused by *BSND* mutations, at least in some cases (12, 15). Additionally, according to Fahlke and collaborators, *BSND* mutations may modify  $\text{ClC-K}$  gating (13, 16-18). This suggests that Barttin is not only a chaperone protein for the  $\text{ClC-K}$   $\text{Cl}^-$  channels, but also a regulator of their activity.

Studies following the cloning of Barttin have reported several properties of  $\text{ClC-Ka}$  and  $\text{ClC-Kb}$  co-expressed with Barttin, notably their activation by external  $\text{Ca}^{2+}$  and inhibition by external  $\text{H}^+$  (11, 14, 19). The same studies also measured the currents generated by some pathogenic mutants of  $\text{ClC-Kb}$  (5, 6, 8) in the oocyte-expression system (11, 14, 19). However, the functional consequences of mutations of  $\text{ClC-Kb}$  on channel activity has not been systematically investigated, partly because the expression of  $\text{ClC-Kb}$  is rather low compared to that of  $\text{ClC-Ka}$  (20). In this study, we analyzed 5 novel mutations (L81P, G246R, R351P, G424E and L439P) plus 2 previously published mutations not functionally characterized before (R92W and R438H) (5, 8, 21). All the mutations inhibited the expression of the channel at the plasma membrane, either partially or totally, thus reducing or nullifying

the  $\text{Cl}^-$  current. Mutations in the *CLCNKB* and *BSND* genes appear to have diverse functional consequences, since some Barttin mutants do not alter ClC-Kb/Barttin trafficking to the plasma membrane (17), whereas all the ClC-Kb mutants reported here displayed reduced cell surface expression.

## RESULTS

### *Clinical data*

Clinical data from patients carrying the mutations described in this study are shown in Table 1. Patients BR067 and BR100 presented with failure to thrive in their first year of life, and had a diagnosis of BS. Patient BR060 was diagnosed as an adult, but was classed as BS due to a previous history of lithiasis. Patients GT027 and GT143 had an initial diagnosis of Gitelman syndrome (diagnosed in the second decade of life, with hypomagnesemia and hypocalciuria). Two patients were compound heterozygotes. Of the three patients with homozygous mutations, only patient BR060 exhibited familial consanguinity. MLPA did not detect deletions or duplications in either of the other two patients.

### *Mutations reduce ClC-Kb currents to a variable extent*

We injected the cRNA of wild-type (WT) and mutant human ClC-Kb together with that of human Barttin into *Xenopus laevis* oocytes to characterize functionally ClC-Kb mutants. The current-voltage (*I-V*) relationships obtained from the oocytes expressing WT ClC-Kb are shown in Figure 1b (*filled squares*). ClC-Kb WT channels had a typical s-shaped *I-V* relationship (14, 17, 22), which was conserved by all the mutants displaying a residual current (L81P, R92W and R351P). We failed to record any current with the G246R, G424E, R438H and L439P mutants (Figure 1).

### *Sensitivity to external pH and calcium is unchanged in mutants*

Characteristically, ClC-Kb and ClC-Ka are stimulated by external calcium and inhibited by protons (11, 14, 23). Although the physiological relevance of these regulations may be open to question, their alteration could clearly have a pathological impact. We therefore investigated the sensitivity to external pH of the three mutants showing residual current. *I-V* relationships for WT ClC-Kb at several different extracellular pH values are shown in Figure 2a. WT ClC-Kb currents at pH 6.0 (Figure 2a, *open squares*) were indistinguishable from those observed in non-injected oocytes (data not shown). Similar levels of current were observed in the presence of iodide (data not shown), which blocks ClC-Kb currents (23), indicating that external  $H^+$  can fully inhibit WT ClC-Kb. The effect of extracellular pH on WT ClC-Kb can be described by a Hill equation (Figure 2b), with a half-maximal pH for inhibition ( $pK_H$ ) of  $7.82 \pm$

0.51,  $n = 20$ , and a slope factor greater than one ( $n_H = 1.5 \pm 0.6$ ; see Table 2). We observed no change in the pH sensitivity of any of the mutants (see Figure 2b and Table 2).

We investigated the sensitivity to external  $\text{Ca}^{2+}$  at pH 7.4.  $I$ - $V$  relationships for WT ClC-Kb at different extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ ) are shown in Figure 2c. WT ClC-Kb conductance plotted as a function of  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$  was described by a Hill equation with a half-maximal concentration for activation ( $K_{Ca}$ ) of  $8.9 \pm 1.4$  mM,  $n = 23$ , and a slope factor close to 2 ( $2.1 \pm 0.4$ ; see Figure 2d and Table 2). There was no alteration in  $K_{Ca}$  and slope for L81P, R92W and R351P mutants (see Figure 2d and Table 2). As previously noted (23), ClC-Kb currents did not fall to zero when  $\text{Ca}^{2+}$  was reduced to 1 mM or below at pH 7.4, but reached a plateau, indicating that part of the ClC-Kb current was independent of  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ . We estimated the  $\text{Ca}^{2+}$ -independent fraction of ClC-Kb conductance in a separate protocol by superfusing oocytes with ND96 at pH 5.0 or 96 mM NaI solutions, two conditions in which ClC-Kb currents are inhibited. The contribution of the  $\text{Ca}^{2+}$ -independent fraction of ClC-Kb conductance was similar between WT and mutants (see Table 2).

### *Reduced surface expression correlates with reduced conductance*

The mutants examined fell into 2 categories, those that carried virtually no current (G246R, G424E, R438H and L439P) and those showing some residual conductance (L81P, R92W and R351P). We investigated the surface expression of the mutants in the oocyte-expression system using a chemiluminescence assay and taking advantage of the extracellular FLAG-tag placed on ClC-Kb. We also found two different patterns of expression: (i) the normalized chemiluminescence signals were significantly reduced for L81P, R92W and R351P mutants as compared to WT ClC-Kb, in direct proportion to the significant decrease in their current amplitudes (Figure 3); (ii) the luminescence responses for G246R, G424E, R438H and L439P mutants were not different from those observed in non-injected oocytes, which was consistent with the absence of significant current in the oocytes expressing these mutants (Figure 3). Altogether, the data suggest that reduced targeting to the plasma membrane is the main functional consequence of these mutations.

### *These mutations have the same functional consequences when ClC-Kb mutants are expressed in HEK293 cells*

We confirmed these findings using whole cell recording on HEK293 cells transiently transfected with WT or mutant ClC-Kb together with Barttin (Figure 4a). Janssen *et al.* (17)

had previously noticed that ClC-Kb currents were small, about 5 fold lower than ClC-Ka currents (about 5 nA for ClC-Ka vs 1 nA for ClC-Kb at +100 mV). The present ClC-Kb recordings were in the same range ( $1.3 \pm 0.2$  nA or  $151 \pm 23$  pA/pF at +100 mV). We assessed the pH-sensitive and insensitive currents at -140 mV to avoid the contamination of endogenous currents appearing at high positive voltages at pH 5.5 or lower. There was a qualitative agreement with the data obtained on *Xenopus laevis* oocytes but the currents produced in HEK293 cells by the mutants showing residual current were lower than the currents in oocytes: R92W and R351P ClC-Kb currents were significantly lower than their WT counterparts by 40 and 75%, approximately (vs ~25 and 30% in the oocyte expression system) and L81P (70% reduction of current in the oocyte expression system) produced no significant pH-sensitive current at -140 mV (Figure 4a). The currents carried by the other mutants (G246R, R438H and L439P) were indistinguishable from those in non-transfected cells and were insensitive to external acid pH (Figure 4b). A summary of the results is shown in Figure 4b as a histogram of pH-sensitive and insensitive currents recorded at -140 mV.



## DISCUSSION

We evaluated the functional consequences of seven mutations in the *CLCNKB* gene from patients with type 3 BS. All the mutations altered the expression of ClC-Kb at the plasma membrane, although to variable extents.

### *Non-conducting mutants*

Four mutants carried no current and had no surface expression. Two of these mutations, R438H and L439P, are located in the  $\alpha$ -helix N, while G424E is in the M-N linker (Figure 5). Glycine 424 is part of GXFXP motif, which participates in coordinating the Cl<sup>-</sup> ion at the external site  $S_{\text{ext}}$  within the selectivity filter (24). The R438H mutation has been reported previously, but was not functionally analyzed at the time (5, 8). Another mutation in the same position, R438C (6), produced a 90% lower current than WT (11) but its surface expression was not evaluated. In its close vicinity, Y432H (6) was investigated before the discovery of Barttin using a hybrid construct of rat ClC-K1 and human ClC-Kb (22). It also produced a very small current. Several mutations of the *CLCN1* gene causing myotonia have been described in corresponding region of the ClC-1 protein (Figure 5): G482R, which corresponds exactly to G424E in ClC-Kb, has not been functionally analyzed (25) but neither P480L nor R496S ClC-1 (see Figure 5) produced any current in oocytes (26, 27); M485V ClC-1 (number 427 in ClC-Kb) displayed reduced single-channel conductance and altered gating (25, 28). Finally, three *CLCN7* mutations causing osteopetrosis (G521R, R526Q and R526W, see Figure 5), and two *CLCN5* mutations causing Dent's disease (G462V and L469P, see Figure 5) are also located in  $\alpha$ -helix N (29, 30). The two ClC-5 mutants produced no current (31, 32). Taken together, the data available for ClC-1, ClC-Kb, ClC-5 and ClC-7 indicate that  $\alpha$ -helix N is very sensitive to changes in amino acid residues, and that these changes usually produce mutants that are not targeted to the plasma membrane.

The non-conducting mutation G246R is located within  $\alpha$ -helix I (Figure 5), which is part of the dimer interface (33, 34). It may be anticipated that replacement of neutral glycine by a charged arginine would alter the helical structure of  $\alpha$ -helix I and therefore interfere with ClC-Kb dimerization.

### *Partially active mutants*

The three mutants, L81P, R92W and R351P, displayed a residual current. The reduction in surface expression is likely to be the sole cause for their reduced activity function, since we detected no change in the sensitivity to extracellular  $H^+$  and  $Ca^{2+}$ . Mutation L81P resulted in a severely-impaired current (70% reduction in oocytes, 100% in HEK293 cells), and is located at the end of  $\alpha$ -helix B, a domain involved in the binding of ClC-Kb to Barttin (15) (Figure 5). At the same location, a homozygous W80C mutation in ClC-Ka has been reported, which contributed to one case of BS type 4b with digenic inheritance (it was associated with homozygous deletion of *CLCNKB*) (10). Also at the same location, the R83G ClC-Ka polymorphism has been recently associated with an increased risk of heart failure (35). Both mutations generate 50%-reduced current compared to WT ClC-Ka. The simplest interpretation for reduced surface expression would be that the L81P mutation partially destabilizes the binding of Barttin to ClC-Kb. The R92W and R351P mutations have the less severe functional consequences; R92W is located within  $\alpha$ -helix C; the substitution of non-polar tryptophan for arginine might destabilize  $\alpha$ -helix C. R351P lies in the K-L linker just before  $\alpha$ -helix L. Yu et al. (36) recently reported a distinct mutation in position 351, R351W with altered sensitivity to  $Ca^{2+}$ , a conclusion to take cautiously since the maximum currents from this mutant are very low (less than 1  $\mu A$ ). The various ClC-1 mutations reported in the vicinity of the same regions (see Figure 5) provide little information, except that they induce little change in the voltage-dependent gating of this channel.

### *Correlation between the phenotype and genotype*

In this study, the R92W mutation is associated with a moderate reduction in current (25 to 30% depending on the expression model), and the patient harboring this hemizygous mutation has a mild phenotype (Table 1). Similarly, for the patient with the R351P/L439P mutations, the mild phenotype might be due to the fact that the current is largely preserved in the R351P ClC-Kb mutant (30 to 75% reduction). Conversely, the L81P and G246R ClC-Kb mutants had current reductions of 70-100 and 100%, respectively; accordingly patients harboring these mutations show a severe phenotype (Table 1). These findings indicate that there is some positive correlation between the level of residual current as measured in heterologous expression systems and the severity of the disease. Clearly, however, this is far from always being the case. Homozygous mutations leading to totally non-conductive channels can be associated with a moderate phenotype. This is the case in this study for one

of the two patients with a homozygous G424E mutation and for the patient with a homozygous R438H mutation (Table 1). Zelikovic et al. (8) have previously reported that the clinical features of a large kindred of patients homozygous for the R438H mutation can be quite variable, ranging from classic Bartter to Gitelman syndrome. More generally, it appears that the severity of the disease can be quite variable in patients within the same family carrying the same homozygous mutation (6-8, 37) or in patients in whom both alleles have been deleted (6, 38). On the one hand, this suggests that some kind of compensation can occur in the thick ascending limb (37) possibly via the ClC-Ka Cl<sup>-</sup> channel, the K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> co-transporter (5), or some other Cl<sup>-</sup> channel (39). On the other hand, it may simply highlight our present lack of knowledge about the relevant physiological control of this channel. Nevertheless, our data taken as a whole suggest that a partially preserved ClC-Kb function explains to some extent the wide phenotypic variability observed in patients with type 3 BS.

### Conclusions

This study of pathogenic mutations in the *CLCNKB* gene suggests that altered expression at the plasma membrane is the main functional defect caused by these mutations. This contrasts with functional studies of mutations in the *CLCN1* gene causing myotonia, most of which report alterations in conductance and gating rather than a reduction in surface expression. It is also at variance with the mutations in the *CLCN5* gene that cause Dent's disease, where a number of mutations do not alter the trafficking of the protein to the plasma membrane or early endosomes. Furthermore, the ClC-5 mutations that do alter trafficking do so because they are located at the dimer interface and therefore disrupt the dimerization (29). In contrast, we observed only one such possible mutation in the case of ClC-Kb (G246R in  $\alpha$ -helix I). This means that we have to postulate that *CLCNKB* mutations usually alter the 3D structure of each subunit, perhaps impeding or destabilizing the association with Barttin.

Some of the mutants retain partial functionality. One possible long-term strategy for restoring sufficient channel function would be the use of channel activators, because the ClC-Kb open probability is far from being maximal (23). Channel activators do exist for K<sup>+</sup> channels but, as far as we are aware, not, for ClC-Kb (40). However, Pusch and collaborators have reported several ClC-K inhibitors and one ClC-Ka activator (19), which makes this a potentially attractive approach for the future.

## METHODS

### *Molecular Biology*

Human ClC-Kb and Barttin were subcloned into pTLN and pT7T3 expression vectors, respectively, for expression in *Xenopus laevis* oocytes. Capped cRNA were synthesized *in vitro* from wild-type and mutants ClC-Kb expression vectors using the SP6 mMessage mMachine Kit (Ambion, Austin, TX, USA) and from wild-type human Barttin (hBarttin) expression vector using the T7 mMessage mMachine kit (Ambion, Austin, TX, USA). To evaluate the surface expression of WT and mutants ClC-Kb channels in the *Xenopus laevis* oocytes, we externally tagged ClC-Kb by introducing a FLAG epitope between  $\alpha$ -helices L and M (beginning at position 377). This did not interfere with the ability to generate currents (data not shown).

For whole-cell recording, HEK293 cells were transfected with pIRES2-EGFP-Barttin and pRc-CMV-hClC-Kb IRES CD8 plasmids by electroporation. Including CD8 antigen allowed to identify cells expressing ClC-Kb/hBarttin channels (41). Site-directed mutagenesis was performed with the Quickchange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA). All constructs were fully sequenced.

### *Voltage-clamp in Xenopus laevis oocytes*

Defolliculated *X. laevis* oocytes were injected with 10 ng of ClC-Kb cRNAs and 5 ng of hBarttin cRNA, and were kept at 16°C in modified Barth's solution containing (in mM): 88 NaCl, 1 KCl, 0.41 CaCl<sub>2</sub>, 0.32 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.82 MgSO<sub>4</sub>, 10 HEPES, pH 7.4 and gentamicin (20 µg/ml). Two-electrode voltage-clamp recordings were performed at room temperature using either TEV-200A amplifier (Dagan, Minneapolis, MN, USA) or TURBO TEC-10CX (npi electronic GmbH, Tamm, Germany) and PClamp 9 software (Axon Instruments, USA), two-three days after injection. Currents were recorded in response to a voltage protocol consisting of 20 mV steps from -160 mV to +100 mV during 800 ms from a holding potential of -30mV. Steady state current at the end of each voltage step was taken for data analysis. The data were filtered at 500 Hz, digitized using a digidata 1440A analogue-to-digital converter and Axon pClamp 9 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Standard (ND96) solution contained (in mM): 96 NaCl, 2 KCl, 3 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 HEPES, pH 7.4. MES instead of HEPES was used as a buffer to obtain a pH of less than 7.0,

and Trizma Base for pH values above 8.0. We studied the effect of calcium on ClC-Kb currents by adding  $\text{CaCl}_2$  to a bath solution containing 120 mM NaCl (0.5 to 3 mM). For higher concentrations of calcium (5, 10, 15 and 20 mM), we replaced the appropriate amounts of NaCl by  $\text{CaCl}_2$  in order to keep a final  $[\text{Cl}]_{\text{ext}}$  of 120 mM. We considered that the small variations in osmolality were negligible. An ND96 1 mM  $\text{CaCl}_2$  solution at pH 5.0, and a solution in which 96 mM NaI had been substituted for the NaCl were used concurrently to estimate the level of endogenous currents.

### *Surface labeling of oocytes*

Experiments were performed as previously described (42), using an anti-FLAG M2 monoclonal antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as the primary antibody, and a peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) as secondary antibody. Chemiluminescence was quantified in a Turner TD-20/20 luminometer (Turner Designs, Sunnyvale, CA, USA) by placing individual oocytes in 50  $\mu\text{l}$  of SuperSignal Elisa Femto Maximum Sensitivity Substrate Solution (Pierce, Rockford, IL, USA).

### *Whole-cell recording in HEK293 cells*

The experiments were performed on 35-mm cell culture plastic Petri dishes mounted on the inverted stage of a microscope 20 h after transfection. The bath solution contained (in mM): 140 NaCl, 2  $\text{CaCl}_2$ , 1  $\text{MgCl}_2$ , 22 sucrose and 10 HEPES, pH 7.4. The pipette solution contained (in mM): 100 sodium gluconate, 33 CsCl, 1  $\text{MgCl}_2$ , 2 EGTA, 1  $\text{Na}_3\text{ATP}$  and 10 HEPES, pH 7.4. Standard whole-cell recordings were performed using an Axopatch 200B (Axon Instruments, USA). The bath was grounded via an agar 150 mM KCl bridge. Patch-clamp pipettes had resistances of 2-3 M $\Omega$ . The voltage protocol consisted of 20 mV steps of 200 ms duration from -160 mV to +100 mV, followed by a 20 ms-pulse at -125 mV.

### *Statistics*

Results are shown as mean  $\pm$  SEM ( $n$ ), where  $n$  indicates the number of experiments. Statistical significance was analyzed by paired Student's t-test, or by ANOVA and the Holm-Sidak test using SigmaStat software (SPSS, Erkrath, Germany).  $P < 0.05$  was considered significant.

## DISCLOSURE

All the authors declare no competing interests.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the patients involved and their families, as well as the nephrologists from the French tubulopathy network who referred the patients' DNA to the genetic department of the European Georges Pompidou Hospital in Paris. We also wish to thank María-Isabel Niemeyer (Valdivia, Chile) for her help in the whole-cell recording experiments, Prof. T.J. Jentsch (Berlin, Germany) and Prof. A.L. George (Nashville, Tennessee, USA) for kindly providing the human Barttin and ClC-Kb for expression in *Xenopus laevis* oocytes and in HEK293 cells, respectively. We acknowledge the helpful technical contribution of Maher Elhage. The English text was edited by M. Ghosh.

## REFERENCES

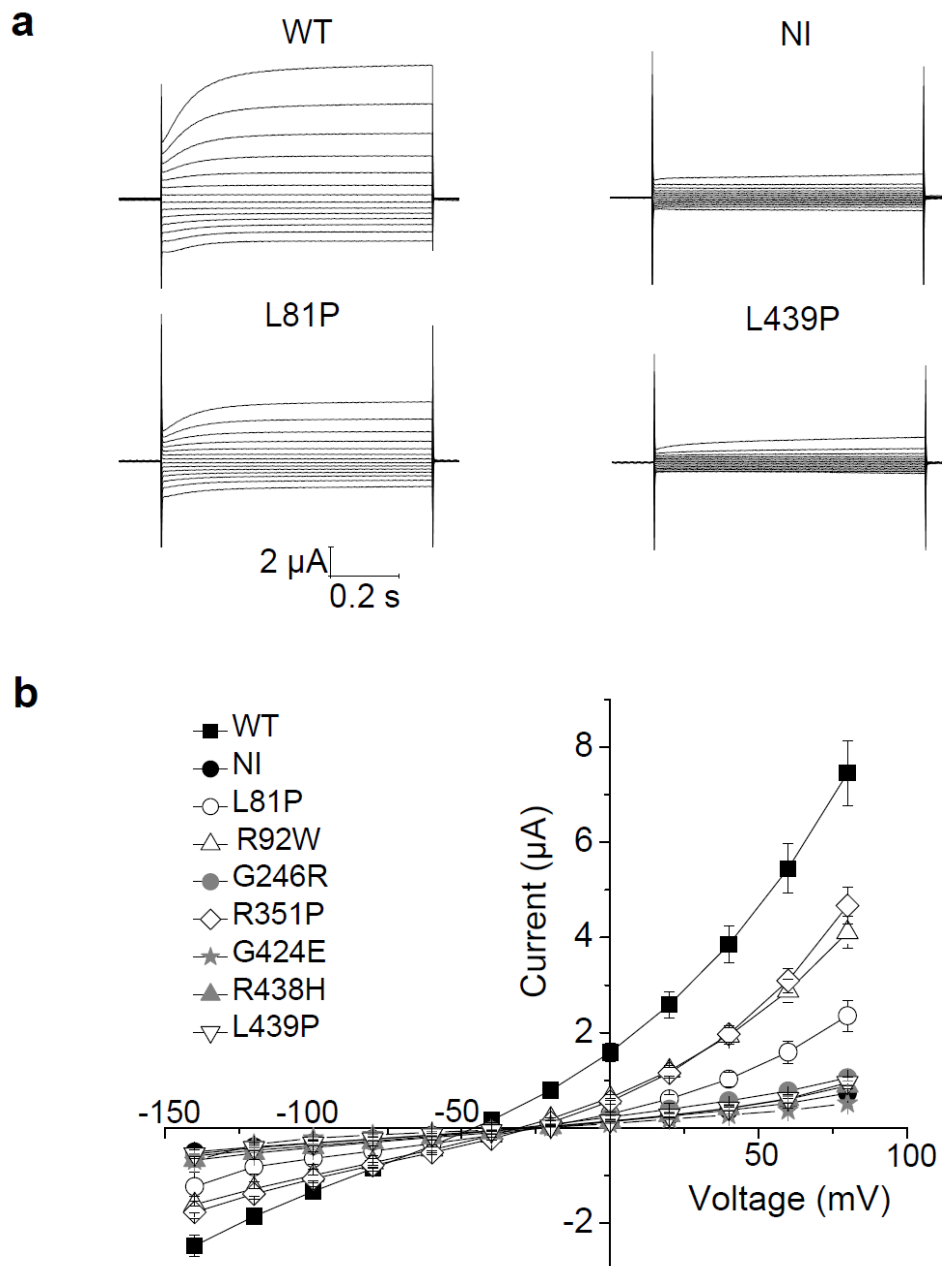
1. Vargas-Poussou R, Huang C, Hulin P, *et al.* Functional characterization of a calcium-sensing receptor mutation in severe autosomal dominant hypocalcemia with a Bartter-like syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**: 2259-2266.
2. Simon DB, Karet FE, Hamdan JM, *et al.* Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat Genet* 1996; **13**: 183-188.
3. Vargas-Poussou R, Feldmann D, Vollmer M, *et al.* Novel molecular variants of the Na-K-2Cl cotransporter gene are responsible for antenatal Bartter syndrome. *Am J Hum Genet* 1998; **62**: 1332-1340.
4. Simon DB, Karet FE, Rodriguez-Soriano J, *et al.* Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K<sup>+</sup> channel, ROMK. *Nat Genet* 1996; **14**: 152-156.
5. Konrad M, Vollmer M, Lemmink HH, *et al.* Mutations in the chloride channel gene CLCNKB as a cause of classic Bartter syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2000; **11**: 1449-1459.
6. Simon DB, Bindra RS, Mansfield TA, *et al.* Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nat Genet* 1997; **17**: 171-178.
7. Jeck N, Konrad M, Peters M, *et al.* Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, leading to a mixed Bartter-Gitelman phenotype. *Pediatr Res* 2000; **48**: 754-758.
8. Zelikovic I, Szargel R, Hawash A, *et al.* A novel mutation in the chloride channel gene, CLCNKB, as a cause of Gitelman and Bartter syndromes. *Kidney Int* 2003; **63**: 24-32.
9. Birkenhager R, Otto E, Schurmann MJ, *et al.* Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nat Genet* 2001; **29**: 310-314.
10. Schlingmann KP, Konrad M, Jeck N, *et al.* Salt wasting and deafness resulting from mutations in two chloride channels. *N Engl J Med* 2004; **350**: 1314-1319.
11. Estevez R, Boettger T, Stein V, *et al.* Barttin is a Cl<sup>-</sup> channel beta-subunit crucial for renal Cl<sup>-</sup> reabsorption and inner ear K<sup>+</sup> secretion. *Nature* 2001; **414**: 558-561.
12. Hayama A, Rai T, Sasaki S, *et al.* Molecular mechanisms of Bartter syndrome caused by mutations in the BSND gene. *Histochem Cell Biol* 2003; **119**: 485-493.
13. Scholl U, Hebeisen S, Janssen AG, *et al.* Barttin modulates trafficking and function of ClC-K channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**: 11411-11416.
14. Waldegger S, Jeck N, Barth P, *et al.* Barttin increases surface expression and changes current properties of ClC-K channels. *Pflugers Arch* 2002; **444**: 411-418.

15. Tajima M, Hayama A, Rai T, *et al.* Barttin binds to the outer lateral surface of the ClC-K2 chloride channel. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **362**: 858-864.
16. Fischer M, Janssen AG, Fahlke C. Barttin activates ClC-K channel function by modulating gating. *J Am Soc Nephrol* **21**: 1281-1289.
17. Janssen AG, Scholl U, Domeyer C, *et al.* Disease-causing dysfunctions of barttin in Bartter syndrome type IV. *J Am Soc Nephrol* 2009; **20**: 145-153.
18. Riazuddin S, Anwar S, Fischer M, *et al.* Molecular basis of DFNB73: mutations of BSND can cause nonsyndromic deafness or Bartter syndrome. *Am J Hum Genet* 2009; **85**: 273-280.
19. Gradogna A, Pusch M. Molecular Pharmacology of Kidney and Inner Ear CLC-K Chloride Channels. *Front Pharmacol* 2010; **1**: 130.
20. Fahlke C, Fischer M. Physiology and pathophysiology of ClC-K/barttin channels. *Front Physiol* 2010; **1**: 155.
21. Vargas-Poussou R, Dahan K, Kahila D, *et al.* Spectrum of mutations in Gitelman syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2011; **22**: 693-703.
22. Waldegger S, Jentsch TJ. Functional and structural analysis of ClC-K chloride channels involved in renal disease. *J Biol Chem* 2000; **275**: 24527-24533.
23. Gradogna A, Babini E, Picollo A, *et al.* A regulatory calcium-binding site at the subunit interface of ClC-K kidney chloride channels. *J Gen Physiol* 2011; **136**: 311-323.
24. Dutzler R, Campbell EB, MacKinnon R. Gating the selectivity filter in ClC chloride channels. *Science* 2003; **300**: 108-112.
25. Meyer-Kleine C, Steinmeyer K, Ricker K, *et al.* Spectrum of mutations in the major human skeletal muscle chloride channel gene (CLCN1) leading to myotonia. *Am J Hum Genet* 1995; **57**: 1325-1334.
26. Lorenz C, Meyer-Kleine C, Steinmeyer K, *et al.* Genomic organization of the human muscle chloride channel ClC-1 and analysis of novel mutations leading to Becker-type myotonia. *Hum Mol Genet* 1994; **3**: 941-946.
27. Pusch M, Steinmeyer K, Koch MC, *et al.* Mutations in dominant human myotonia congenita drastically alter the voltage dependence of the ClC-1 chloride channel. *Neuron* 1995; **15**: 1455-1463.
28. Wollnik B, Kubisch C, Steinmeyer K, *et al.* Identification of functionally important regions of the muscular chloride channel ClC-1 by analysis of recessive and dominant myotonic mutations. *Hum Mol Genet* 1997; **6**: 805-811.
29. Lourdel S, Grand T, Burgos J, *et al.* ClC-5 mutations associated with Dent's disease: a major role of the dimer interface. *Pflugers Arch* 2012; **463**: 247-256.



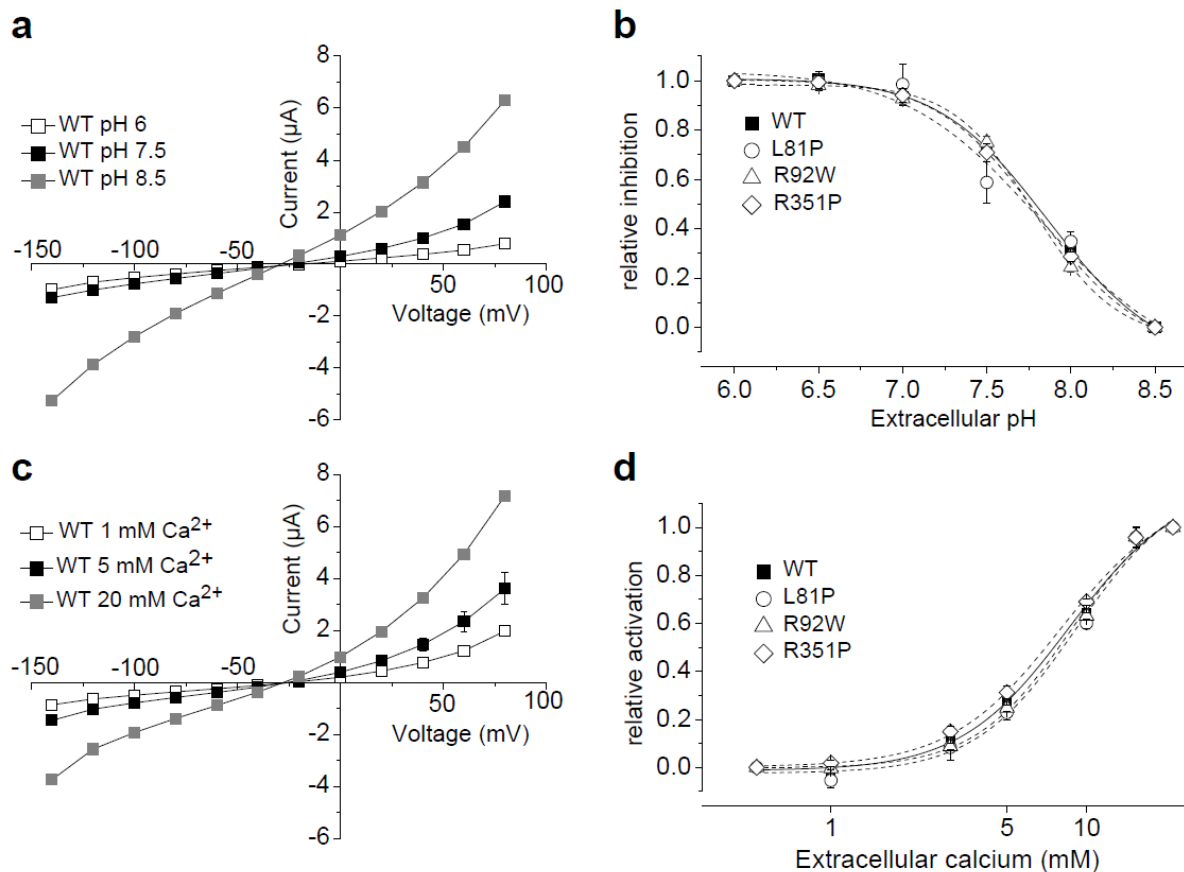
30. Pangrazio A, Pusch M, Caldana E, *et al.* Molecular and clinical heterogeneity in CLCN7-dependent osteopetrosis: report of 20 novel mutations. *Hum Mutat* 2010; **31**: E1071-1080.
31. Grand T, Mordasini D, L'Hoste S, *et al.* Novel CLCN5 mutations in patients with Dent's disease result in altered ion currents or impaired exchanger processing. *Kidney Int* 2009; **76**: 999-1005.
32. Ludwig M, Doroszewicz J, Seyberth HW, *et al.* Functional evaluation of Dent's disease-causing mutations: implications for CIC-5 channel trafficking and internalization. *Hum Genet* 2005; **117**: 228-237.
33. Duffield M, Rychkov G, Bretag A, *et al.* Involvement of helices at the dimer interface in CIC-1 common gating. *J Gen Physiol* 2003; **121**: 149-161.
34. Robertson JL, Kolmakova-Partensky L, Miller C. Design, function and structure of a monomeric CIC transporter. *Nature* 2010; **468**: 844-847.
35. Cappola TP, Matkovich SJ, Wang W, *et al.* Loss-of-function DNA sequence variant in the CLCNKA chloride channel implicates the cardio-renal axis in interindividual heart failure risk variation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; **108**: 2456-2461.
36. Yu Y, Xu C, Pan X, *et al.* Identification and functional analysis of novel mutations of the CLCNKB gene in Chinese patients with classic Bartter syndrome. *Clin Genet* 2009; **77**: 155-162.
37. Brochard K, Boyer O, Blanchard A, *et al.* Phenotype-genotype correlation in antenatal and neonatal variants of Bartter syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2009; **24**: 1455-1464.
38. Schurman SJ, Perlman SA, Sutphen R, *et al.* Genotype/phenotype observations in African Americans with Bartter syndrome. *J Pediatr* 2001; **139**: 105-110.
39. Marvao P, De Jesus Ferreira MC, Bailly C, *et al.* Cl<sup>-</sup> absorption across the thick ascending limb is not altered in cystic fibrosis mice. A role for a pseudo-CFTR Cl<sup>-</sup> channel. *J Clin Invest* 1998; **102**: 1986-1993.
40. Hibino H, Inanobe A, Furutani K, *et al.* Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* 2010; **90**: 291-366.
41. Jurman ME, Boland LM, Liu Y, *et al.* Visual identification of individual transfected cells for electrophysiology using antibody-coated beads. *Biotechniques* 1994; **17**: 876-881.
42. Zerangue N, Schwappach B, Jan YN, *et al.* A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* 1999; **22**: 537-548.
43. Pusch M. Myotonia caused by mutations in the muscle chloride channel gene CLCN1. *Hum Mutat* 2002; **19**: 423-434.

# FIGURES, TABLES AND LEGENDS



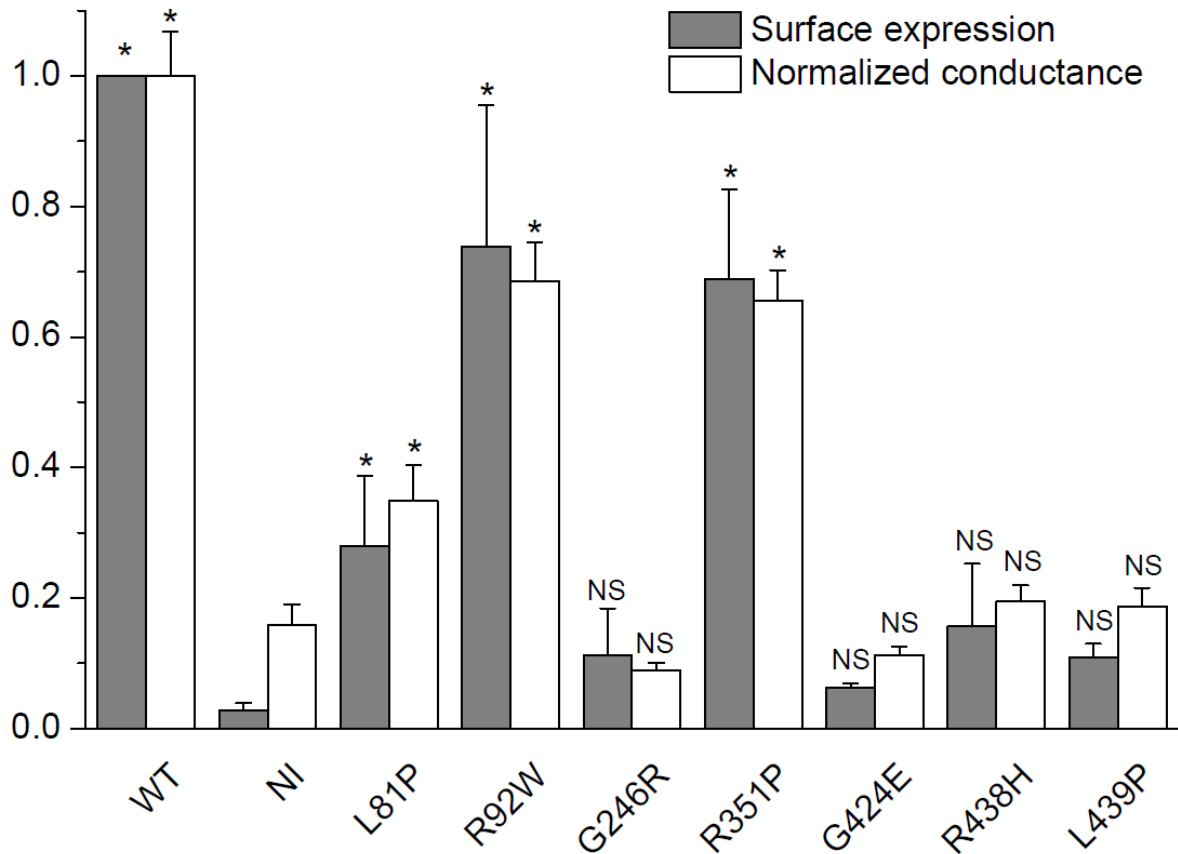
**Figure 1**

**Figure 1. Mutant CIC-Kb Cl<sup>-</sup> channels display decreased function.** **(a)** Representative voltage-clamp recordings obtained from oocytes expressing wild-type (WT) CIC-Kb and hBarttin, non-injected oocytes (NI) and oocytes expressing L81P and L439P mutants. **(b)** Steady-state current-voltage relationships obtained in ND96 solution (10 mM Ca<sup>2+</sup>, pH 7.4) for non-injected oocytes (NI) and oocytes expressing WT or L81P, R92W, G246R, R351P, G424E, R438H and L439P mutant CIC-Kb channels together with hBarttin. Each data point represents the mean  $\pm$  SEM for at least 7 oocytes from three different oocyte batches (WT,  $n = 58$ ; L81P,  $n = 12$ ; R92W,  $n = 7$ ; G246R,  $n = 15$ ; R351P,  $n = 10$ ; G424E,  $n = 8$ ; R438H,  $n = 18$ ; L439P,  $n = 17$ ).



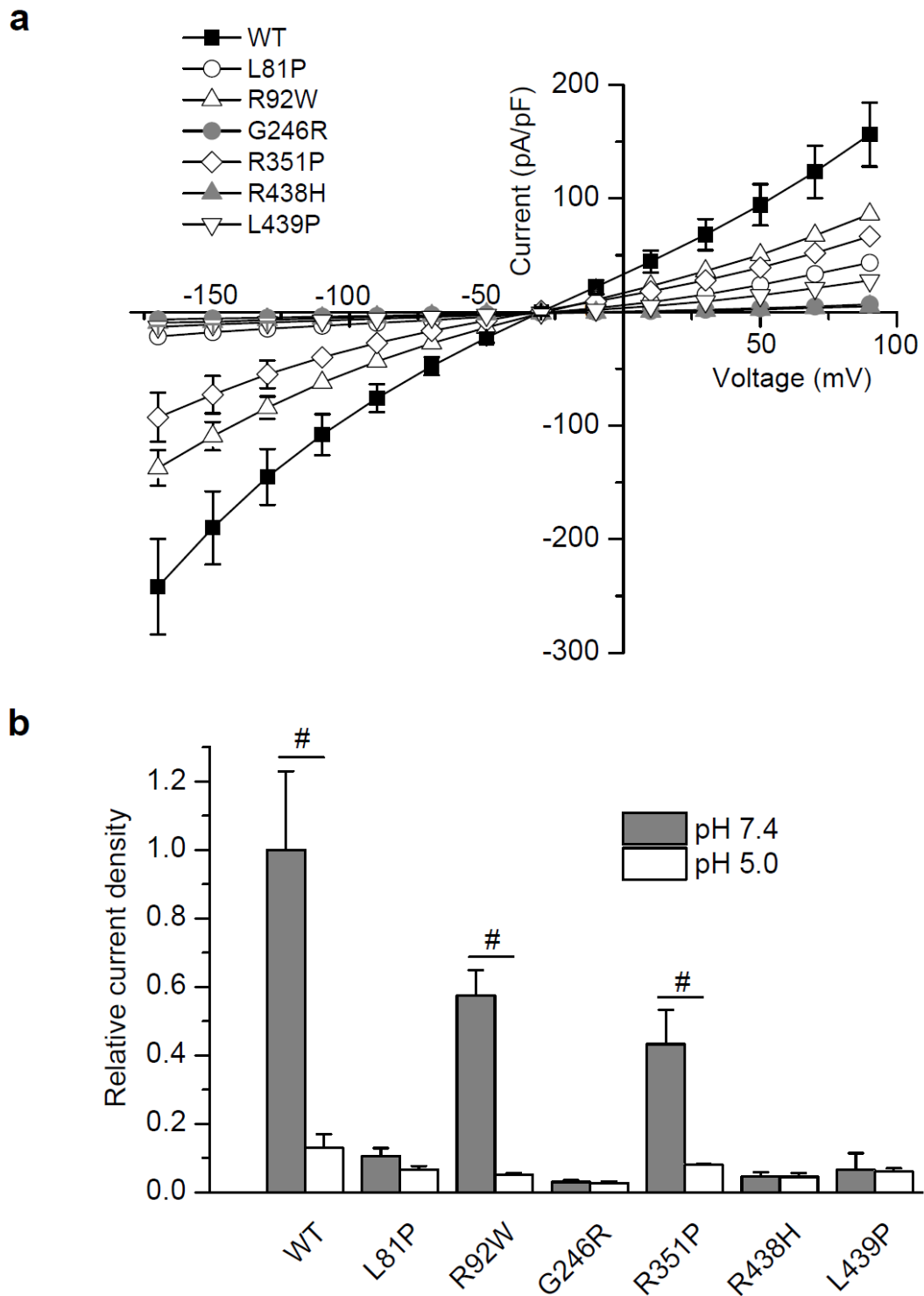
**Figure 2**

**Figure 2. Dependence of wild-type and CIC-Kb mutants upon external pH and  $\text{Ca}^{2+}$ .** **(a)** Current-voltage relationships of wild-type (WT) CIC-Kb at different extracellular pH values. **(b)** Relative inhibition of conductance at +60 mV ( $G_{+60 \text{ mV}}$ ), calculated as  $[G_{+60 \text{ mV}}(\text{pH } x) - G_{+60 \text{ mV}}(\text{pH } 8.5)] / [G_{+60 \text{ mV}}(\text{pH } 8.5) - G_{+60 \text{ mV}}(\text{pH } 6.0)]$ , is plotted as a function of external pH for WT, L81P, R92W, and R351P. The lines represent the best fits obtained using the Hill equation. Each data point represents the mean  $\pm$  SEM for at least 7 oocyte batches (WT,  $n = 30$ ; L81P,  $n = 7$ ; R92W,  $n = 22$ ; R351P,  $n = 18$ ). **(c)** Current-voltage relationships of WT CIC-Kb at different extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations. **(d)** Stimulation of  $G_{+60 \text{ mV}}$  by extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , calculated as  $[G_{+60 \text{ mV}}(x \text{ mM } \text{Ca}^{2+}) - G_{+60 \text{ mV}}(0.5 \text{ mM } \text{Ca}^{2+})] / [G_{+60 \text{ mV}}(20 \text{ mM } \text{Ca}^{2+}) - G_{+60 \text{ mV}}(0.5 \text{ mM } \text{Ca}^{2+})]$ , is plotted as a function of external  $\text{Ca}^{2+}$  for WT, L81P, R92W and R351P CIC-Kb. The lines represent the best fits obtained using the Hill equation. Each data point represents the mean  $\pm$  SEM for at least 10 oocytes from 2 different oocyte batches (WT,  $n = 23$ ; L81P,  $n = 12$ ; R92W,  $n = 11$ ; R351P,  $n = 10$ ).



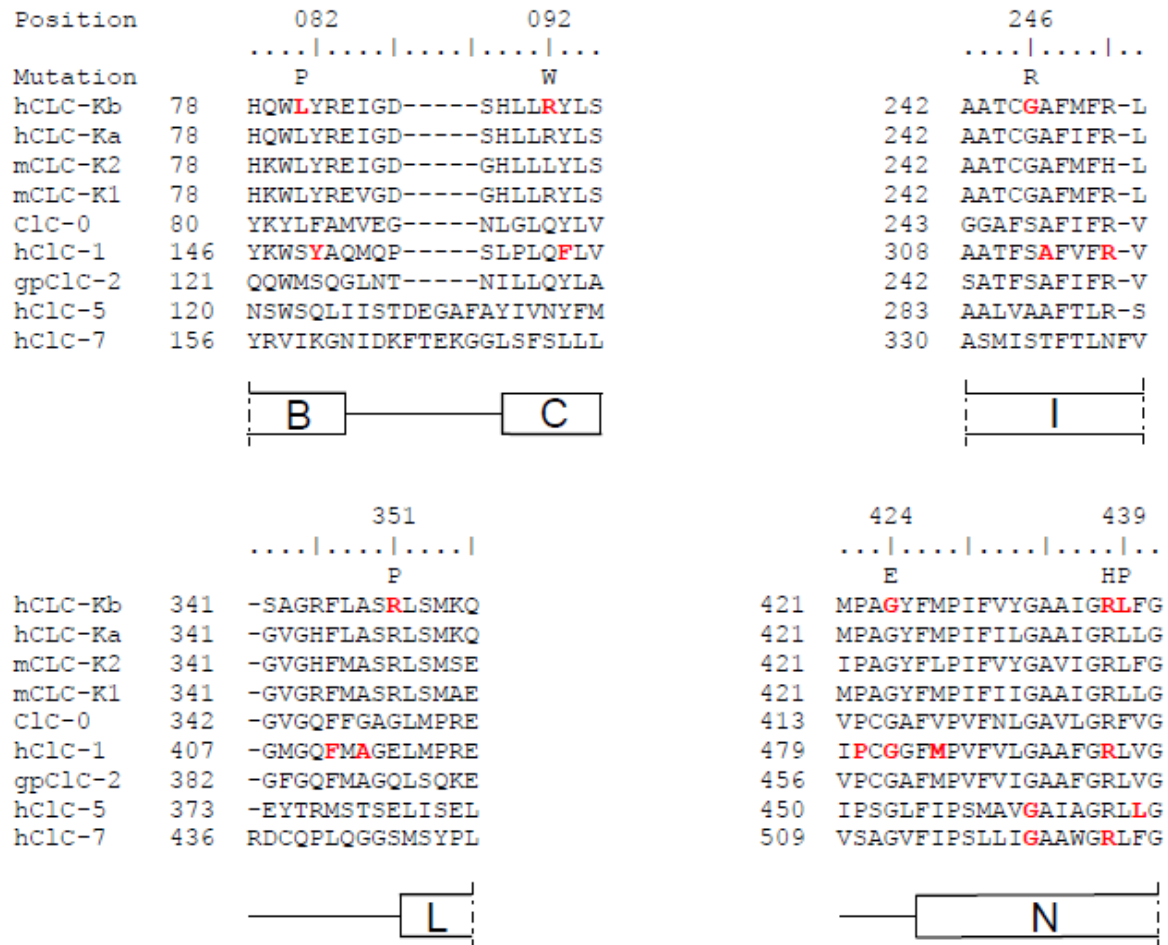
**Figure 3**

**Figure 3. Decreased conductance is correlated to decreased surface expression.** Conductance at +60 mV ( $G_{+60\text{ mV}}$ ) in ND96 solution (10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 7.4) is normalized to the mean value for wild-type (WT) CIC-Kb. For cell surface expression, the values (measured in RLU, Relative Light Units) were normalized to those of WT CIC-Kb in the same batch of oocytes. Each column represents the mean  $\pm$  SEM for at least 7 oocytes from 3 different batches for conductance (see Figure 1), and at least 60 oocytes from three different batches for surface expression. All conductance and luminescence values for mutants were significantly different from corresponding WT values; \*,  $P < 0.05$  is the difference between WT or mutant CIC-Kb vs NI.



**Figure 4**

**Figure 4. Whole-cell current recording from HEK293 transfected cells coexpressing wild-type or mutant CIC-Kb with hBarttin. (a)** Current-voltage relationships from cells expressing wild-type (WT) or L81P, R92W, G246R, R351P, R438H and L439P mutants. **(b)** Histogram showing the currents at -120 mV for WT and mutant CIC-Kb channels, compared to WT, at pH 7.4 and 5.0. Number of observations: WT,  $n = 11$ ; L81P,  $n = 7$ ; R92W,  $n = 7$ ; G246R,  $n = 5$ ; R351P,  $n = 6$ ; R438H,  $n = 6$ ; L439P,  $n = 5$ .



**Figure 5**

**Figure 5. Amino acid sequence alignment of hCLC-Kb, hCLC-Ka, mCLC-K2, mCLC-K1, CLC-0, hCLC-1, gpCLC-2, hCLC-5 and hCLC-7.** The position of the *CLCNKB* mutations characterized in this study is indicated in red. Also highlighted in red are the mutations of *CLCN1* that cause myotonia (43), the mutations of *CLCN5* that cause Dent's disease (29), and the mutations of *CLCN7* that cause osteopetrosis (29, 30). The corresponding predicted  $\alpha$  helices are shown below the alignment. The alignment was performed using BioEdit.

**Table 1. Clinical characteristics and mutations detected in the *CLCNKB* gene in patients with Bartter/Gitelman syndrome**

Patient	BR067	GT027	BR060	BR100	BT099	BR122	GT143
Sex	M	F	F	F	M	M	F
Age at diagnosis (years)	0.4	20	0.5	28	13	1	30
Clinical presentation	Failure to thrive, vomiting	Fortuitous detection of hypokalemia	Failure to thrive	Cramps, fatigue	Failure to thrive	Failure to thrive, polyuria	diarrhea, cramps
Plasma							
Na <sup>+</sup> (mM)	129	140	ND	ND	ND	126	138
K <sup>+</sup> (mM)	1.9	2.2	3	2	2.8	2.3	2.5
Cl <sup>-</sup> (mM)	73	103	76	ND	91	65	97
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mM)	36	30	33	ND	32	45	33
Mg <sup>2+</sup> (mM)	1.20	0.67	0.9	ND	0.78	1.02	0.73
Renin <sup>§</sup>	10	ND	ND	ND	2.3	ND	6.5
Aldosterone <sup>§</sup>	0	1.2	ND	ND	ND	ND	1.3
Urinary Ca <sup>2+</sup> /creatinine (mmol/mmol)	1.29	ND	0.8	ND	ND	2.77	0.2
Nephrocalcinosis/stones	No/Yes	ND	No/No	No/Yes	No/No	No/No	No/No
Mutations							
Nucleotide <sup>§§</sup>	c.242T>C <sup>a</sup>	c.274C>T/ c.(?_30)_(?220_?)del <sup>b</sup> p.Arg92Trp/?	c.736G>C <sup>a</sup>	c.1052G>C/ c.1316T>C <sup>b</sup>	c.1271G>A <sup>a</sup>	c.1271G>A <sup>a</sup>	c.1313G>A <sup>a</sup>
Protein	p.Leu81Pro		p.Gly246Arg	p.Arg351Pro/ p.Leu439Pro	p.Gly424Glu	p.Gly424Glu	p.Arg438His***
Exon	4	4/ whole gene deletion	8	11/14	13	13	14
Reference	This study	This study/5	This study	30/this study	This study	This study	5,8

<sup>§</sup>, times above the upper limit for age; <sup>§§</sup>, Numbering is according to the cDNA sequence (GenBank : NM\_000085.3). The A of the ATG of the initiator Methionine codon is denoted as nucleotide 1; <sup>a</sup> homozygous; <sup>b</sup> compound heterozygous; \*\*\* A large heterogeneity of the severity of the disease has been noticed in 12 members of the same family (8).

ClC-Kb	Sensitivity to pH		Sensitivity to calcium		$Ca^{2+}$ -independent $G$ (in % of $G_{max}$ )
	$pK_H$	$n_H$	$K_{Ca}$ (mM)	$n_{Ca}$	
WT	$7.82 \pm 0.51$ (20)	$1.5 \pm 0.6$ (20)	$8.9 \pm 1.4$ (23)	$2.1 \pm 0.4$ (23)	$22 \pm 3$ (13)
L81P	$7.74 \pm 0.67$ (11)	$1.2 \pm 0.8$ (11)	$9.5 \pm 1.7$ (12)	$2.2 \pm 0.6$ (10)	$31 \pm 11$ (8)
R92W	$7.77 \pm 0.13$ (18)	$1.8 \pm 0.3$ (18)	$9.0 \pm 1.0$ (11)	$2.3 \pm 0.4$ (11)	$38 \pm 8$ (6)
R351P	$7.78 \pm 0.40$ (13)	$1.5 \pm 0.5$ (13)	$8.3 \pm 0.9$ (10)	$2.0 \pm 0.3$ (11)	$23 \pm 4$ (4)

**Table 2. Parameters of the sensitivity to external pH and calcium for wild-type and mutant ClC-Kb channels.** The conductances were measured at several  $H^+$  concentrations (in presence of 3 mM  $Ca^{2+}$ ) or at different  $Ca^{2+}$  concentrations (at pH 7.4), and the plots were best fitted by Hill equation. The  $Ca^{2+}$ -independent fraction of the conductance was evaluated in a distinct protocol in which currents of WT and mutant ClC-Kb channels were recorded in presence of 1 mM and 20 mM  $Ca^{2+}$  (pH 7.4). ND96, 1 mM  $Ca^{2+}$ , pH 5.0 or 96 mM sodium iodide, 1 mM  $Ca^{2+}$ , pH 7.4 solutions were used to estimate the level of the endogenous currents. The numbers in parentheses indicate the number of observations.  $K_H$  is the proton concentration causing 50% inhibition (here expressed as  $pK_H$ ),  $K_{Ca}$  the calcium concentration causing 50% activation,  $n_H$  and  $n_{Ca}$  the Hill coefficients for  $H^+$  and  $Ca^{2+}$  dependence, respectively. There was no significant difference between values analyzed with ANOVA.



## 2. Seconde publication: Reduced surface expression and blunted pH-dependent gating of CLC-KB chloride channel in mild Bartter syndrome caused by *CLCNKB* mutation within the selectivity filter

### 2.1. Résumé

Dans cet article, nous avons étudié fonctionnellement une mutation faux-sens fréquente du CLC-KB, puisqu'elle est retrouvée chez huit patients atteints d'un syndrome de Bartter, consistant en la substitution de la valine 170 en méthionine. La valine 170 est localisée sur l'hélice F, une région importante pour la sélectivité et le gating de tous les CLC, et est très proche de la valine 166 qui, chez tous les autres CLC, correspond au « gating glutamate » responsable du gating des protopores.

Comme pour le premier article, nous avons d'abord analysé les données cliniques de ces huit patients. Tous ont été diagnostiqués tardivement et présentent un phénotype modéré à « asymptomatique ». Quatre des huit patients présentent cette mutation à l'état homozygote, tandis que quatre patients portent la mutation V170M seulement sur un de leurs deux allèles et montrent une autre mutation sur leur autre allèle (large délétion, décalage du cadre de lecture, Y236X et G433E). Parmi ces autres mutations, trois représentent clairement des mutations « perte de fonction » : large délétion, décalage du cadre de lecture et mutation non-sens (Y236X).

À l'aide de mesures dans des ovocytes de xénope, nous avons démontré que les courants, mesurés dans un milieu extracellulaire contenant 3mM  $\text{Ca}^{2+}$  à pH 9,0, et l'expression à la membrane plasmique du mutant V170M sont réduits d'environ 50% par rapport au CLC-KB sauvage. En revanche, lorsque le milieu extracellulaire contient 1mM  $\text{Ca}^{2+}$  à pH 7,4, les courants transitants par ces canaux mutés sont supérieurs à ceux transitant par les canaux sauvages. Ces résultats sont contradictoires par rapport à nos données obtenues par patch-clamp en cellule entière sur les HEK293. En effet, nous avons démontré que les courants, dans un milieu extracellulaire contenant 2mM  $\text{Ca}^{2+}$  à pH 7,4, transitant par les canaux mutés V170M sont diminués d'environ 80 % comparés à ceux transitant par les canaux sauvages. Ces observations exposent la limite du modèle ovocyte qui reflète probablement moins les conséquences de la mutation V170M que les cellules rénales humaines HEK293.

La mutation V170M n'a qu'un effet limité sur les perméabilités anioniques du CLC-KB. En revanche, elle altère profondément la sensibilité des canaux au calcium et au pH extracellulaires. En effet, le  $pK_H$  se déplace vers une valeur acide ( $6,00 \pm 0,11$ ) comparée à celle du CLC-KB sauvage ( $7,60 \pm 0,05$ ). De plus, à pH 7,4 la mutation V170M semble rendre le CLC-KB insensible au calcium extracellulaire car nous n'observons aucune augmentation des courants entre 3mM et 20mM  $Ca^{2+}$ . Cependant, à pH 6,0 la mutation V170M entraîne un retour à une sensibilité au calcium extracellulaire. La substitution de la valine 170 en méthionine ne supprime donc pas la sensibilité au calcium externe mais altère plus spécifiquement la sensibilité au pH externe.

En complément des précédentes observations, nous avons analysé les propriétés de régulation de mutants artificiels à la position 170 afin de vérifier si les altérations observées pour le mutant V170M sont bien dues à l'acide aminé substitué. La substitution de la valine 170 en sérine ou en isoleucine présente un profil intermédiaire comparé à la substitution en méthionine. Ceci démontre l'impact crucial de la substitution de la valine 170 par une méthionine sur la sensibilité au pH externe du CLC-KB.

La valine 170 étant très proche de la valine 166 qui, chez tous les autres CLC, correspond au « gating glutamate » responsable du gating des protopores, il nous a semblé nécessaire d'explorer les conséquences fonctionnelles de la substitution de la valine 166 en méthionine et alanine. Nous avons constaté que ces mutations n'entraînent pas les conséquences fonctionnelles spectaculaires que nous avons observées par la substitution de la valine 170 en méthionine.

Quatre patients portent la mutation V170M seulement sur un de leurs deux allèles et montrent une autre mutation sur leur autre allèle (large délétion, Y236X, G433E et E643G) dont trois d'entre-elles représentent clairement des mutations « perte de fonction ». Or, nous avons démontré que la mutation G433E ne laisse subsister aucune activité électrique : le niveau de production de courant n'est pas significativement différent de celui produit par les ovocytes non injectés. Par ailleurs, nous avons également observé que les mutants G433E ne sont pas exprimés à la membrane plasmique des ovocytes de xénope. Nous avons étudié la combinaison des mutations V170M et G433E dans l'ovocyte de xénope. Les courants portés par la combinaison des deux mutations ne sont pas significativement différents des courants portés par la mutation V170M dont la quantité d'ARN a été réduite de moitié. L'expression à la membrane plasmique de la combinaison des deux canaux mutés n'est pas

significativement différente de celle du canal muté V170M dont la quantité d'ARN a été réduite de moitié. De plus, la sensibilité au pH et au calcium extracellulaires des mutants combinés est identique à celle du mutant V170M seul. L'ensemble de ces résultats semble donc indiquer qu'aucune interaction ne se produise entre les canaux V170M et les canaux G433E.

En conclusion, cette étude d'une mutation fréquente du CLC-KB, V170M, localisée dans une région importante pour la sélectivité et le gating de tous les CLC, montre une caractéristique jamais décrite pour une mutation du CLC-KB. En effet, cette mutation entraîne à la fois un défaut d'expression à la membrane plasmique mais également, et de façon surprenante, une altération du gating. Cette altération du gating tend à rendre les canaux mutés « hyperactifs » sous des conditions physiologiques (en effet, dans un milieu extracellulaire contenant 1mM  $\text{Ca}^{2+}$  à pH7,4, la conductance des canaux mutés est doublée en comparaison de celle des canaux CLC-KB sauvages), tandis que la diminution d'expression à la membrane plasmique tend à réduire le nombre de canaux mutés « hyperactifs ». Ces deux observations sont en accord avec le phénotype modéré des patients présentant la mutation V170M. D'un point de vue mécanistique, la mutation ne semble pas altérer directement le site proton, ni les sites calciques.

## 2.2. Article

### **Reduced surface expression and blunted pH-dependent gating of ClC-Kb chloride channel in mild Bartter syndrome caused by *CLCNKB* mutation within the selectivity filter**

Mathilde Keck<sup>1,2</sup>, Olga Andrini<sup>1,2</sup>, Sébastien L'Hoste<sup>1,2</sup>, Rodolfo Briones<sup>3</sup>, Teddy Grand<sup>1,2</sup>, Francisco V. Sepúlveda<sup>4</sup>, Rosa Vargas-Poussou<sup>5,7</sup>, Anne Blanchard<sup>6,7</sup>, Stéphane Lourdel<sup>1,2</sup> and Jacques Teulon<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>UPMC Université Paris 06, UMR\_S 872, Laboratoire de génomique, physiologie et physiopathologie rénales, F-75005, Paris, France. <sup>2</sup>INSERM, UMR\_S 872, Laboratoire de génomique, physiologie et physiopathologie rénales, F-75005, Paris, France. <sup>3</sup>Department of Theoretical and Computational Biophysics, Max-Planck Institute for Biophysical Chemistry, Am Fassberg 11, 37077 Göttingen Germany; <sup>4</sup>Centro de Estudios Científicos, Avenida Arturo Prat 514, Valdivia 5110466, Chile; <sup>5</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Département de Génétique F-75908, Paris, France; <sup>6</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Centre d'Investigation Clinique, F-75908, Paris, France; <sup>7</sup>Université Paris-Descartes, Faculté de Médecine, F-75006, Paris, France.

**Running head:** ClC-Kb Bartter mutation alters pH sensitivity

**Keywords:** ClC-Kb; mutation; Bartter syndrome; chloride channel; extracellular pH

#### **Address for correspondence:**

Jacques Teulon, UMR\_S 872, team 3, 15 rue de l'Ecole de Médecine, 75720 Paris Cedex 06, France

phone: 33.1.55.42.78.64

fax: 33.1.46.33.41.72

E-mail: jacques.teulon@upmc.fr

## ABSTRACT

ClC-Kb is a member of the ClC family of Cl<sup>-</sup> channels/transporters, and participates in NaCl absorption in the distal nephron of the kidney. Mutations in the *CLCNKB* gene cause Bartter syndrome type-3, a hereditary renal salt-losing tubulopathy that is associated with hypokalemic metabolic alkalosis. Here, we investigate the functional consequences of a valine to methionine substitution at position 170, which was detected in 8 patients displaying a mild phenotype. Conductance and surface expression were reduced by ~40-50% as compared to wild-type. Inhibition by external H<sup>+</sup>, a characteristic property of ClC-Kb together with stimulation by Ca<sup>2+</sup>, was dramatically altered whereas stimulation by Ca<sup>2+</sup>, no longer detectable at pH 7.4, could be revealed at low pH. ClC-Kb bears another valine in position 166, where other ClC proteins harbor a glutamate crucial for channel gating. Mutations in this position had only moderate functional consequences, emphasizing the specific importance of valine 170. In conclusion, the V170M mutant displays a complex pattern of alterations and provides novel insights into the genotype-phenotype relationship in Bartter syndrome with a mild presentation.

## INTRODUCTION

Bartter syndrome (BS) is a hereditary renal tubule disorder characterized by renal salt wasting, hypokalemic metabolic alkalosis, and secondary hyperaldosteronism. Five genetic BS variants have been identified on the basis of the type of ion system transport or receptor targeted by gene mutations (Hebert, 2003; Jeck et al, 2005; Unwin & Capasso, 2006). Type-3, classical BS is due to the loss of function of the CIC-Kb Cl<sup>-</sup> channel encoded by the *CLCNKB* gene (Konrad et al, 2000; Simon et al, 1997). Patients with type-3 BS may present a variable phenotype, ranging from a severe antenatal presentation to a mild phenotype similar to Gitelman syndrome (Jeck et al, 2000; Zelikovic et al, 2003).

In the kidney this channel is present in the distal nephron, particularly in the thick ascending limb and the distal convoluted tubule, where it mediates the basolateral step of Cl<sup>-</sup> absorption. CIC-Kb and the closely-related CIC-Ka belong to the CIC family of Cl<sup>-</sup> channels and transporters, the founding member of which is CIC-0, the Cl<sup>-</sup> channel of the electric organ of Torpedo fish. These two channels require the Barttin regulatory subunit to reach the membrane (Birkenhager et al, 2001), but are otherwise structurally similar to other CIC proteins. The conducting and gating properties of the CIC channels have been most studied on CIC-0 and CIC-1, and have received confirmation from the elucidation of the crystal structure of prokaryotic and eukaryotic CIC (Dutzler et al, 2003; Feng et al, 2010). According to the current view, the CIC Cl<sup>-</sup> channels function as dimers with two independent protopores; their complex gating includes a fast voltage-dependent gate that acts on the protopores, and a slow common gate, quite distinct in CIC-0, but more difficult to distinguish in CIC-1 and CIC-2 (Chen, 2005; Pusch, 2004). A Glu residue, located at position 166 in CIC-0 or position 148 in ecCIC-1, has to be protonated to allow Cl<sup>-</sup> passage to occur; it confers voltage and pH sensitivity to CIC-0 and CIC-1 protopores (Chen, 2005; Pusch, 2004).

CIC-K channels have certain specific features. The 'gating' glutamate, which is absent in CIC-Kb and CIC-Ka, is replaced by Val at the relevant 166 position. As a consequence, CIC-Kb and CIC-Ka do not appear to be very voltage sensitive (Fahlke & Fischer, 2010). CIC-Ka and CIC-Kb are stimulated by extracellular Ca<sup>2+</sup> and inhibited by extracellular protons (Estevez et al, 2001; Gradogna et al, 2011; Uchida et al, 1995; Waldegger et al, 2002). While the sensitivity to Ca<sup>2+</sup> is unique to these channels, sensitivity to pH is a common property of all CIC proteins, but it generally acts in the opposite way, with acidification stimulating rather

than inhibiting ClC Cl<sup>-</sup> channels (Jentsch, 2008; Pusch, 2004). In a recent exhaustive study, Gradogna *et al.* (Gradogna et al, 2011) identified possible sites for the Ca<sup>2+</sup> and H<sup>+</sup> action on the outer aspect of the protein. These regulatory properties, as such, are of unknown impact under physiological conditions, where the pH and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> are maintained within a narrow range. However, as *CLCNKB* mutations alter the sensitivity to these parameters they could have critical pathological consequences.

Here, we report a group of BS patients harboring the mutation p.Val170Met (V170M) in homozygous mode or associated with another loss-of-function mutation. These patients display a mild phenotype or may even be asymptomatic, and exhibit hypokalemic alkalosis and secondary hyperaldosteronism. Investigating the functional consequences of this mutation, we found two antagonistic effects. First, membrane expression was reduced by 50% in oocytes. Second, the sensitivity to extracellular pH and Ca<sup>2+</sup> was dramatically altered: V170M ClC-Kb is maximally fully active at pH 7.4 in the presence of 1 mM Ca<sup>2+</sup>. This might partly counterbalance the reduced membrane expression and alleviate the phenotype of these patients. From a mechanistic point of view, our results indicate that the region around position 170, which is important for gating in other ClC channels, also plays a major role in ClC-Kb.

## RESULTS

### *Clinical data*

The clinical data are shown in Table 1. The patients, who had all been diagnosed in adulthood and had a mild clinical presentation, displayed renal hypokalemia, metabolic alkalosis, normal plasma magnesium, and secondary hyperaldosteronism. They do not display severe chloride depletion as described in type-3 BS (Brochard et al, 2009). The urinary calcium/creatinine ratio was normal or increased. Three patients (BR in Table 1) had an initial diagnosis of BS on the basis of the association of polyuria, hypercalciuria, or lithiasis. The remaining patients were diagnosed as Gitelman syndrome, in three cases following the fortuitous discovery of hypokalemia.

All patients are from non consanguineous families. Nevertheless, four of them are homozygous for the V170M mutation. In all of them a heterozygous deletion was excluded by MLPA technology. The remaining four patients are compound heterozygous for the V170M mutation with a second mutation. For 3 of them the second mutation is clearly a loss of function mutation (a whole gene deletion, a frameshift, and a nonsense mutation, respectively). A missense mutation (p.Gly433Glu or G433E) was detected in the last patient.

### *Functional consequences of the V170M mutation*

We injected the cRNA of wild-type (WT) or V170M ClC-Kb into *Xenopus laevis* oocytes together with the cRNA of Barttin. Examples of current traces and the corresponding current-voltage relationships for WT and V170M ClC-Kb/Barttin channels, as well as for non-injected oocytes, are shown in Fig 1A. A reduction in the V170M current is apparent, with the conductance ( $G$ ) for V170M being ~40% lower than that of WT ClC-Kb (Fig 1C). Investigating the surface expression of WT and mutant ClC-Kb in the oocyte expression system with ClC-Kb–FLAG (see Methods), we observed that the expression of V170M at the membrane was 50% lower than WT (Fig 1C). We also measured pH-sensitive ClC-Kb currents on HEK293 cells transiently transfected with WT or V170M ClC-Kb together with Barttin (Fig 1D). WT currents were small (1 nA or  $151 \pm 23$  pA/pF at +100 mV), as previously reported by Janssen *et al.* (Janssen et al, 2009), and the mutation V170M current was reduced by 90%, much more than compared to currents in the oocyte (Fig 1D).



We assessed the relative permeability of WT and V170M ClC-Kb to  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{I}^-$  in oocytes (see Supporting Information Fig 1). As shown in Supporting Information Fig 1C, the relative permeabilities for  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{I}^-$  were significantly lower for V170M than for WT but the mutation did not change the anion selectivity sequence. The contrasting shapes of the current/voltage relationships (Supporting Information Fig 1A, 1B) are probably due to the fact that these three anions have an inhibitory effect on WT ClC-Kb (Picollo et al, 2004; Rychkov et al, 1998), but not on V170M. These findings suggest that the amino acid at position 170 is within, or close to, the protopore.

### *Sensitivity to external pH is dramatically altered in the V170M mutant*

Since ClC-Kb is stimulated by external  $\text{Ca}^{2+}$  and inhibited by  $\text{H}^+$  (Estevez et al, 2001; Gradogna et al, 2011; Waldegger et al, 2002), we measured  $G$  under several pH and  $\text{Ca}^{2+}$  conditions as a first approach to possible alterations of these parameters. The results shown in Supporting Information Fig 2 suggest that the sensitivity of V170M to both  $\text{H}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  is altered. In addition, WT and V170M currents at pH 5.0 were indistinguishable from those observed in the presence of iodide (Supporting Information Fig 2), which blocks ClC-Kb currents (Gradogna et al, 2011), or from those in non-injected oocytes. We therefore considered that external  $\text{H}^+$  fully inhibits both WT, which was consistent with previous results (Gradogna et al, 2011), and V170M ClC-Kb.

We then went on to analyze the sensitivity to pH in detail. The inhibition of ClC-Kb by extracellular  $\text{H}^+$  is illustrated in Fig 2B that shows pH inhibition curves. Acidification inhibited WT ClC-Kb with a half-maximal inhibition pH ( $pK_H$ ) of  $7.60 \pm 0.05$  ( $n = 31$ ), and a Hill coefficient higher than 1 ( $n_H = 1.50 \pm 0.10$ ; see Table 2). These results are qualitatively similar to those obtained by Gradogna et al. with ClC-Ka (Gradogna et al, 2011), and by Jeck et al. with ClC-Kb (Jeck et al, 2004). The V170M mutation dramatically altered the sensitivity of ClC-Kb to pH. Looking to the traces shown in Fig 2A, it is apparent that V170M currents are higher than WT currents at pH 7.0 but do not increase any further at pH 8.5, while there is a robust increase in the case of WT currents. Indeed, we observed that the  $pK_H$  shifted to a very acidic value ( $6.00 \pm 0.11$ ,  $n = 8$ ; Fig 2B and Table 2) with significant increase in  $n_H$  ( $2.82 \pm 0.18$ ).

### *Sensitivity to external calcium disappears in the V170M mutant when assessed at pH 7.4*

For WT ClC-Kb at pH 7.4,  $G$  increased as a function of external  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig 3). This is qualitatively similar to the data obtained by Gradogna et al. (Gradogna et al, 2011) for ClC-Ka under different experimental conditions. In sharp contrast to WT currents, V170M currents measured at pH 7.4 had similar amplitudes at 3 mM and 20 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig 3A), suggesting that V170M is insensitive to  $\text{Ca}^{2+}$  at the concentration range tested (see Fig 3B). A similar observation was also made at pH 9.0 (Supporting Information Fig 2). As a result, we may speculate that the V170M current would be higher than WT ClC-Kb current under physiological conditions (1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 7.4) for comparable plasma membrane expression levels. We also considered the possibility that sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$  was in fact preserved in the mutant, but not detectable at pH 7.4, a pH that produces maximum activation of V170M. Indeed, a  $\text{Ca}^{2+}$  dose-response curve plotted at pH 6.0 clearly showed that the mutant did remain sensitive to  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig 3C).

In these experiments,  $G$  corresponds to the total conductance recorded from the oocytes, and includes a small endogenous current component. In a separate protocol, we estimated  $\text{Ca}^{2+}$ -independent  $G$  due to ClC-Kb by perfusing oocytes with ND96 at pH 5.0, a condition under which ClC-Kb currents are totally inhibited, and a modified ND96 solution containing 20 mM  $\text{Ca}^{2+}$  at pH 9.0, to provide an estimate of the maximum conductance; the  $\text{Ca}^{2+}$ -independent fraction of ClC-Kb conductance represents  $15 \pm 5\%$  of the maximum current for WT ( $n = 11$ ),  $85 \pm 2\%$  for V170M at pH 7.4 ( $n = 8$ ), and  $26 \pm 4\%$  for V170M at pH 6.0 ( $n = 8$ ).

### *Sensitivity to external pH in non-pathogenic mutants*

As a complement to the above observations, we investigated the regulation properties of additional, artificial mutants at position 170 in order to find out whether the dramatic alterations observed in V170M depended on the substituted amino acid involved (Supporting Information Fig 2 and Fig 4). The replacement of Val 170 by Ser or Ile had intermediate effects as compared to replacement by Met (see Fig 4B), shifting  $pK_H$  towards a more acidic value (V170S:  $pK_H = 7.15 \pm 0.09$ ;  $n = 6$ ; V170I:  $pK_H = 6.88 \pm 0.08$ ,  $n = 8$ ) without any significant change in the slope factor (see Table 2). Taken together, these results highlight the crucial impact of the Val to Met replacement on pH sensitivity.

Not very far from position 170, Glu (equivalent position 166 in ClC-Kb) plays a key role in the protopore gating of ClC  $\text{Cl}^-$  channels, but is not present in ClC-Ka and ClC-Kb,

which harbor a Val at the relevant position. Given the major change in regulation observed for V170M, we thought necessary to investigate the consequences of other mutations at this position, and substituted Ala or Met for Val at position 166. V166A ClC-Kb produced larger currents than V166M (Fig 5A, see also Supporting Information Fig 2), but both mutants could be monitored for sensitivity to pH. The results illustrated in Fig 5B indicate a limited shift in pH sensitivity for V166A ( $pK_H = 7.13 \pm 0.09$ ,  $n = 7$ ) and no significant change for V166M ( $pK_H = 7.83 \pm 0.08$ ,  $n = 8$ ) when compared to the WT ( $pK_H = 7.60 \pm 0.05$ ,  $n = 31$ ). There was no change in  $n_H$  (Table 2). In conclusion, mutating Val 166 to other neutral amino acids differing in bulk has no spectacular functional consequences.

### *Effects of the combined expression of V170M and G433E ClC-Kb mutants*

Three of the patients shown in Table 1 display loss-of-function mutations (whole *CLCNKB* gene deletion, frameshift and nonsense) on one allele and a c.508G>A (p.Val170Met) mutation on the other. Simplistic reasoning would anticipate a more severe clinical presentation for such patients, as the result of a lower residual Cl<sup>-</sup> current. Rather unexpectedly, this is not what is observed (Table 1). Nor is it observed in the case of a fourth patient, who is compound heterozygous for c.508G>A (p.Val170Met) and has another missense mutation, c.1298G>A (p.Gly433Glu). This prompted us to study the impact of combinations of the V170M and G433E mutants. Fig 6A, B shows examples of traces and current/voltage relationships obtained with WT (10 ng/μl cRNA/oocyte), V170M (5 ng/μl cRNA/oocyte), or G433E (10 ng/μl cRNA/oocyte). G433E ClC-Kb produced no current, and the V170M current was reduced as reported above (Fig 6A). When both mutants were expressed together, the resulting current was not significantly different from that generated by V170M alone (Fig 6A). The results are summarized in Fig 6B and Supporting Information Fig 3C.

We evaluated the surface expression of V170M and G433E using ClC-Kb-FLAG. Expression of G433E was barely detected at the plasma membrane (see Fig 6C). In the following experiments, the cRNAs of V170M and G433E were injected together. As expected, the signal for V170M ClC-Kb/G433E ClC-Kb-FLAG (5 ng cRNA/oocyte each) was not different from the luminescence signal obtained with G433E ClC-Kb-FLAG alone (10 ng cRNA/oocyte). The signals obtained for V170M ClC-Kb-FLAG alone and V170M ClC-Kb-FLAG combined with un-tagged G433E ClC-Kb or G433E ClC-Kb-FLAG were also similar. Taken together, these

results indicate that G433E cannot be driven to the plasma membrane by the presence of V170M. We also investigated the sensitivity to pH and  $\text{Ca}^{2+}$  in oocytes co-injected with V170M and G433E. The results shown in Supporting Information Fig 3A and B clearly indicate that the inhibition by acidification and the stimulation by  $\text{Ca}^{2+}$  are the same as those observed for V170M alone. In conclusion, there is no interaction between the V170M and G433E ClC-Kb channels.

## DISCUSSION

Type-3 Bartter syndrome is caused by loss-of-function mutations of the *CLCNKB* gene that encodes the ClC-Kb Cl<sup>-</sup> channel, which mediates NaCl absorption in the thick ascending limb and the distal convoluted tubule. Compared to other ion transporters and channels implicated in Bartter or Gitelman syndromes, or to the Barttin ClC-K regulatory subunit (Peters et al, 2003; Starremans et al, 2003; Vargas-Poussou et al, 2011), ClC-Kb has undergone little investigation for the functional consequences of pathogenic mutations following the cloning of Barttin (Konrad et al, 2000; Simon et al, 1997; Zelikovic et al, 2003). Here, we have studied one particular mutation, V170M, which is located in  $\alpha$ -helix F, a region important for the selectivity and gating in all ClC proteins. There is a clear reduction in current of this mutant, which was far more pronounced in HEK293 cells than in *Xenopus laevis* oocytes, a phenomenon also encountered with other ClC-Kb mutants according to our own unpublished experience. In addition to impaired current and surface expression, pH and Ca<sup>2+</sup>-dependent gating are profoundly perturbed, a feature so far not reported for ClC-Kb. These changes render the channels hyperactive under physiological conditions, which tend to compensate the functional impact of reduced expression at the membrane.

ClC-Kb channels are inhibited at acid pH. In the case of the mutant, we observed a spectacular  $pK_H$  shift, by nearly two log units, which was accompanied by an augmentation in the Hill coefficient. This suggests that the mutation may not alter directly the H<sup>+</sup> site(s), particularly since there are no titratable amino acids in vicinity of V170 that might participate in H<sup>+</sup> sensing to be affected by the Val to Met mutation. Furthermore, Gradogna et al. (Gradogna et al, 2011) proposed that His 497 constitutes the site responsible for H<sup>+</sup> inhibition in ClC-Ka (and ClC-Kb). This amino acid is located at a considerable distance from Val 170, and so we may assume that V170M has no direct influence on the proposed H<sup>+</sup>-binding site. Many studies have been devoted to the elucidation of pH sensitivity in ion channels, some indicating the presence of well-defined binding sites for H<sup>+</sup> (Honore et al, 2002; Niemeyer et al, 2009; Niemeyer et al, 2007), other indicating more complex processes (Rapedius et al, 2007; Rapedius et al, 2006; Thompson et al, 2008; Trapani & Korn, 2003). For instance, recent work on the voltage-dependent K<sup>+</sup> channel K<sub>v</sub>1.5 has shown that mutations within the pore shifted the sensitivity to extracellular pH without changing the slope factor (Trapani & Korn, 2003). The change in  $pK$  was attributed to disruption of the geometric

environment of an H<sup>+</sup> site by the mutation. In the case of ClC-Kb, however, a comparable hypothesis would require the presence of a second H<sup>+</sup> site in the vicinity of Val 170, which would be entirely speculative in light of the current knowledge. For another K<sup>+</sup> channel, ROMK, in-depth analysis has revealed novel mechanisms that control its exquisite sensitivity to intracellular pH; in particular, it was shown that Lys-Ala pairs in ROMK, or Val-Val pairs in the *Fugu* ROMK ortholog, form intra-subunit H-bonds that are crucial for transducing the movement of cytoplasmic domains into pore closure (Rapedius et al, 2007; Rapedius et al, 2006). Mutations at this location or close to it, which cause Bartter syndrome type II (Peters et al, 2003), reduce the sensitivity to pH by shifting *pK* to more acid values. In other words, channel gating is altered, but not by altering the H<sup>+</sup>-sensing site. Since conduction and gating are intimately linked in the ClC proteins, we suggest that V170M disturbs the protopore-located gating machinery that mediates the effect of protons.

Mutations of the 'gating' glutamate have profound effects on protopore and common gating in other ClC channels (Dutzler et al, 2003; Niemeyer et al, 2009; Traverso et al, 2003; Traverso et al, 2006; Yusef et al, 2006). The ClC-K channels are unique in the ClC family for harboring Val instead of Glu at the relevant position (166 in ClC-K). Analyzing two mutations at this position, we found that the consequences for sensitivity to pH were minor when compared to V170M. This possibly means that Val 170 is more important than Val 166 in the gating of the ClC-Kb channel. Using the structure of the bacterial ecClC as a template for designing a 3D model of ClC-Kb, we observed that Val 170 appeared aligned with Val 166 on helix F and faced the protopore (Fig 7). As a matter of fact, it seems to be closer to the central binding site for Cl<sup>-</sup> than Val 166. This is in agreement with our results showing that V170M mutation slightly alters anion selectivity sequence, and removes the blocking effects of foreign anions.

ClC-K channels are modulated positively by extracellular Ca<sup>2+</sup> (Estevez et al, 2001; Gradogna et al, 2011; Uchida et al, 1995; Waldegger et al, 2002). Dependence on Ca<sup>2+</sup> was observed at all pH values tested for WT ClC-Kb, except at pH 5.0, where the channel is completely closed. Thus, these two phenomena seem to be independent during the normal functioning of the channel (Gradogna et al, 2011). In sharp contrast, V170M showed no Ca<sup>2+</sup> sensitivity at pH 7.4-9.0, but displayed normal stimulation by Ca<sup>2+</sup> at a lower pH of 6.0. The simplest explanation would be that the dependence upon Ca<sup>2+</sup> is entirely preserved in all mutants. This conclusion would be consistent with a recent study identifying the residues

E261 and D278 as responsible for sensitivity to external  $\text{Ca}^{2+}$  (Gradogna et al, 2011). The two residues might form E261-D278  $\text{Ca}^{2+}$ -binding sites across subunit binding sites (Gradogna et al, 2011). They appear to lie on the outer aspect of the protein and would therefore be unlikely to interact with the region containing amino acids 166-170.

However, the pH-dependent modulation of the  $\text{Ca}^{2+}$  effect in mutants points to a possible interaction between the two regulations. A speculative explanation might be that full opening of the V170M ClC-Kb at pH 7.4 prevents further activation by  $\text{Ca}^{2+}$  whereas partial closure at pH 6.0 would restore sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$ . WT ClC-Kb would be sensitive to  $\text{Ca}^{2+}$  at all pH values because the WT ClC-Kb is never fully active. Further investigations are needed to elucidate the mechanisms involved, which lie beyond the scope of the present paper.

It has often proven impossible to correlate genotype and phenotype in patients with *CLCNKB* mutations (Brochard et al, 2009; Jeck et al, 2000; Schurman et al, 2001; Simon et al, 1997; Zelikovic et al, 2003). In the present case, however, the dual functional characteristics of V170M mutation are consistent with the mild phenotype exhibited by the patients homozygous for V170M. The reduced expression of the channel at the membrane reduces the available  $\text{Cl}^-$  current, while the modifications in pH and  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity tend to increase the current carried by a reduced number of channels. The mild presentation of the disease is also encountered in compound heterozygous patients. These patients harbor the V170M mutation on one allele and complete loss-of-function mutations on the other: one patient is heterozygous for a large deletion; two patients have nonsense or frameshift mutations resulting in truncated proteins or unstable mRNA, which are often subject to degradation by nonsense-mediated mRNA decay. The fourth patient harbors the G433E missense mutation, which does not reach the membrane. Despite the fact that  $\text{Cl}^-$  conductance is probably lower in heterozygous than in homozygous patients, the clinical status appears to be quite similar in both groups of patients. Thus, the residual current appears to be sufficient to maintain partial function of  $\text{Cl}^-$  conductance. In conclusion, the complex relationship between reduced surface expression and increased channel activity observed with the V170M mutant sheds new light on genotype-phenotype correlation in Bartter syndrome, particularly in the case of Gitelman-like phenotypes.

## MATERIALS AND METHODS

### *Genetic investigations*

Genetic investigations were performed after obtaining informed consent from the patients. The coding exons and intron-exon junctions of the *CLCNKB* gene were amplified as described elsewhere (Konrad et al, 2000). We carried out direct sequencing, using the dideoxy-chain termination method on an ABI Prism 3730XL DNA Analyzer Sequencer (Perkin Elmer Applied Biosystems®, Foster City, CA), and evaluated sequences with Sequencher software.

To detect large deletions in the *CLCNKB* gene, we used a commercially available kit, the SALSA® MLPA® P266-A1 CLCNKB Kit (MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands). This Kit contains 33 probes: 14 probes for the *CLCNKB* gene (the exons 4, 7, 9, 12, 16 and 20 are not represented), 2 probes for the *CLCNKA* gene and 17 reference probes.

### *Molecular Biology*

Human ClC-Kb and Barttin (kindly provided by T.J. Jentsch, MDC/FMP, Berlin, Germany) were subcloned into pTLN and pT7T3 expression vectors, respectively, for expression in *Xenopus laevis* oocytes. Capped cRNA were synthesized *in vitro* from wild-type and mutant ClC-Kb expression vectors using the SP6 mMessage mMachine Kit (Ambion, Austin, TX, USA) and from wild-type Barttin expression vector using T7 mMessage mMachine kit (Ambion, Austin, TX, USA). For evaluating the surface expression of WT and mutant ClC-Kb channels in the *Xenopus laevis* oocytes, we externally tagged ClC-Kb by introducing a FLAG epitope between  $\alpha$ -helices L and M (beginning at position 377). This did not interfere with the ability to generate currents.

### *Voltage clamp in Xenopus laevis oocytes*

Defolliculated *X. laevis* oocytes were injected with 10 ng of ClC-KB cRNA and 5 ng of Barttin cRNA, and were kept at 16°C in modified Barth's solution containing (in mM): 88 NaCl, 1 KCl, 0.41 CaCl<sub>2</sub>, 0.32 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.82 MgSO<sub>4</sub>, 10 HEPES, pH 7.4 and gentamicin (20 µg/ml). Two-electrode voltage-clamp experiments were performed at room temperature using a TEV-200A amplifier (Dagan, Minneapolis, MN, USA) or TURBO TEC-10CX (npi electronic GmbH, Tamm, Germany) and PClamp 9 software (Molecular Devices, Sunnyvale,



CA, USA), two-three days after injection. Electrodes were pulled to 0.5-2 M $\Omega$ , and filled with 3M KCl. Currents were recorded in response to a voltage protocol consisting of 20 mV steps from -160 mV to +100 mV for 800 ms from a holding potential of -30 mV. The steady-state current at the end of each voltage step was used for data analysis. The data were filtered at 500 Hz, digitized using a Digidata 1440A analogue-to-digital converter, and Axon pClamp 9 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Currents were recorded in a standard (ND96) solution containing (in mM): 96 NaCl, 2 KCl, 1.5 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 HEPES, pH 7.4. MES was used instead of HEPES as a buffer for pH values of less than 7.0, and Trizma Base for pH values of over 8.0. We studied the effect of calcium on ClC-Kb currents by adding CaCl<sub>2</sub> to a bath solution containing 120 mM NaCl (0.5 to 3 mM). For higher concentrations of calcium (5, 10, 15 and 20 mM), we replaced the appropriate amounts of NaCl by CaCl<sub>2</sub> in order to keep the final [Cl<sup>-</sup>] at 120 mM. We considered that the small variations in osmolality were negligible. In our hands, it was not possible to challenge the oocytes with Ca<sup>2+</sup> concentrations lower than 0.5 mM, because this often led to the development of endogenous currents (Gradogna et al, 2011). An ND96 solution at pH 5.0, and a solution in which 120 mM NaI was substituted for the NaCl were used concurrently to estimate the level of endogenous currents. For the anion selectivity experiments, 80 mM Cl<sup>-</sup> was replaced by Br<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> or I<sup>-</sup>. As previously reported (Waldegger & Jentsch, 2000), anion permeability was calculated from the change in reversal potential using the Goldman equation and assuming: (i) that the intracellular ion concentrations did not change during the test and (ii) that endogenous currents remained small compared to ClC-Kb.

A complete current/voltage relationship was established for each oocyte under each of the experimental conditions. The conductance at +60 mV ( $G_{+60\text{ mV}}$ ) was calculated for each measurement as the ratio of the current at +60 mV over the difference between +60 mV and the reversal potential. The effects of pH was quantified by calculating the increase in conductance at +60 mV under the different conditions, using as reference  $G_{+60\text{ mV}}$  measured at pH 6.0 (3 mM Ca<sup>2+</sup>). The data were then expressed relative to the maximal  $G_{+60\text{ mV}}$  (obtained at pH 9.0 for the pH curve, or at 20 mM Ca<sup>2+</sup> for the Ca<sup>2+</sup> curve). A Hill equation was fitted to the data points:

$$G = G_{\min} + (G_{\max} - G_{\min}) \left[ 1 + \left( \frac{K_H}{H^+} \right)^{n_H} \right]^{-1}$$

where,  $G_{\min}$  and  $G_{\max}$  are the minimum and maximum conductances respectively,  $[H^+]$  the proton concentration;  $K_H$ , the concentration causing 50% inhibition or activation and  $n_H$ , the Hill coefficient. In the case of  $Ca^{2+}$ , it was not possible to fit the data to a sigmoid function because there was no clear saturation of the currents up to 20 mM.

### *Surface labeling of oocytes*

Experiments were performed as previously described (Zerangue et al, 1999), using an anti-FLAG M2 monoclonal antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as the primary antibody and a peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) as the secondary antibody. Chemiluminescence was quantified in a Turner TD-20/20 luminometer (Turner Designs, Sunnyvale, CA, USA) by placing individual oocytes in 50  $\mu$ l of SuperSignal Elisa Femto Maximum Sensitivity Substrate Solution (Pierce, Rockford, IL, USA).

### *Whole-cell recording in HEK293 cells*

The experiments were performed on 35-mm cell culture plastic Petri dishes mounted on the inverted stage of a microscope 20 h after transfection. The bath solution contained (in mM): 140 NaCl, 2  $CaCl_2$ , 1  $MgCl_2$ , 22 sucrose and 10 HEPES, pH 7.4. The pipette solution contained (in mM): 100 sodium gluconate, 33 CsCl, 1  $MgCl_2$ , 2 EGTA, 1  $Na_3ATP$  and 10 HEPES, pH 7.4. Standard whole-cell recordings were performed using an Axopatch 200B (Axon Instruments, USA). The bath was grounded to earth via an agar 150 mM KCl bridge. Patch-clamp pipettes had resistances of 2-3 M $\Omega$ . The voltage protocol consisted of 20 mV steps lasting 200 ms from -160 mV to +100 mV, followed by a 20 ms-pulse at -125 mV. We assessed the pH-sensitive and -insensitive currents at -140 mV to avoid the contamination of endogenous currents appearing at high positive voltages at pH 5.5.

### *ClC-Kb homology modeling*

A homology model of ClC-Kb was built based on an alignment done with representative members of the entire ClC family, including ec-ClC. The alignment was

performed with the Multalin web server plus manual adjustments (Corpet, 1988). The homology model was built with Modeller 9v5 (Sali & Blundell, 1993) using as template the PDB structure of the bacterial ec-CIC, 1OTS. A molecular representation of this structure was rendered with Pymol (PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger, LLC).

### *Statistics*

Results are shown as mean  $\pm$  SEM ( $n$ ), where  $n$  indicates the number of experiments. Statistical significance was analyzed by a paired Student's t-test or by ANOVA and the Holm-Sidak test using, SigmaStat software (SPSS, Erkrath, Germany).  $P < 0.05$  was considered significant.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the patients involved and their families, as well as the nephrologists from the French tubulopathy network who referred the patients' DNA to the Genetics department of the European Georges Pompidou Hospital in Paris. We also wish to thank Johanna Burgos (Centro de Estudios Científicos, Valdivia, Chile) for her help in some whole-cell recording experiments, and Prof. T.J. Jentsch (Berlin, Germany) and Prof. A.L. George (Nashville, Tennessee, USA) for kindly providing the human Barttin and CIC-Kb for expression in *Xenopus laevis* oocytes and in HEK293 cells, respectively. This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR) [ANR07-PHYSIO-008-2 and BLAN 2010-111201] and ECOS-sud [C10S03]. The Centro de Estudios Científicos is funded by the Centers of Excellence Base Financing Program of Conicyt. S. L'Hoste and O. Andrini hold ANR postdoctoral fellowship, and M. Keck and T. Grand PhD fellowship from the Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche. The English text was edited by M. Ghosh.

## AUTHORS CONTRIBUTIONS

JT and SL designed the study; MK, OA, SLH and TG performed experiments; RVP and AB analyzed genetic data from the patients; SLH constructed the vectors for the oocyte expression system and introduced FLAG tag; RB and FVS elaborated the CIC-Kb model; JT, MK, OA, SL, SLH and TG analyzed the data; JT, SL and FVS wrote the paper.

## CONFLICTS OF INTEREST

All the authors declare no competing interests.

## THE PAPER EXPLAINED

### PROBLEM

Bartter syndrome is hereditary renal disease characterized by renal salt wasting and hypokalemic metabolic alkalosis that can be due to the loss of function of the ClC-Kb Cl<sup>-</sup> channel encoded by the *CLCNKB* gene. This channel is present in the distal nephron of the kidney where it mediates the basolateral step of Cl<sup>-</sup> absorption. ClC-Kb and the closely-related ClC-Ka belong to the same ClC family of Cl<sup>-</sup> channels and transporters. Unlike other ClC proteins, ClC-Ka and ClC-Kb are stimulated by extracellular calcium and inhibited by extracellular protons. These regulatory properties probably have little impact under physiological conditions, where the pH and calcium are maintained within a narrow range, but may have critical pathological consequences if *CLCNKB* mutations alter the sensitivity to these parameters.

### RESULTS

We report that eight patients harboring the mutation p.Val170Met (V170M) always display a mild phenotype. We investigated the functional consequences of this mutation and found that: 1) membrane expression was reduced by 50%; 2) inhibition by external protons was dramatically altered; 3) stimulation by calcium was no longer apparent at pH 7.4 but could be detected at pH 6.0. Thus, V170M mutation somehow perturbs the transmission of pH effect and renders stimulation by calcium pH-sensitive.

### IMPACT

This study provides novel insights into the genotype-phenotype relationship in Bartter syndrome with a mild presentation. Impaired surface expression and profoundly perturbed pH, and Ca<sup>2+</sup>-dependent gating are two antagonistic functional consequences of mutation V170M. These changes render the channels hyperactive under physiological conditions and tend to alleviate the patients' phenotype. In addition, from a mechanistic point of view, our results show that the valine in position 170, located within a pore-forming region, is important for the gating of the channel.

### FOR MORE INFORMATION

<http://omim.org/entry/602023>

<http://omim.org/entry/607364>

Supporting Information is available at EMBO Molecular Medicine Online.

## REFERENCES

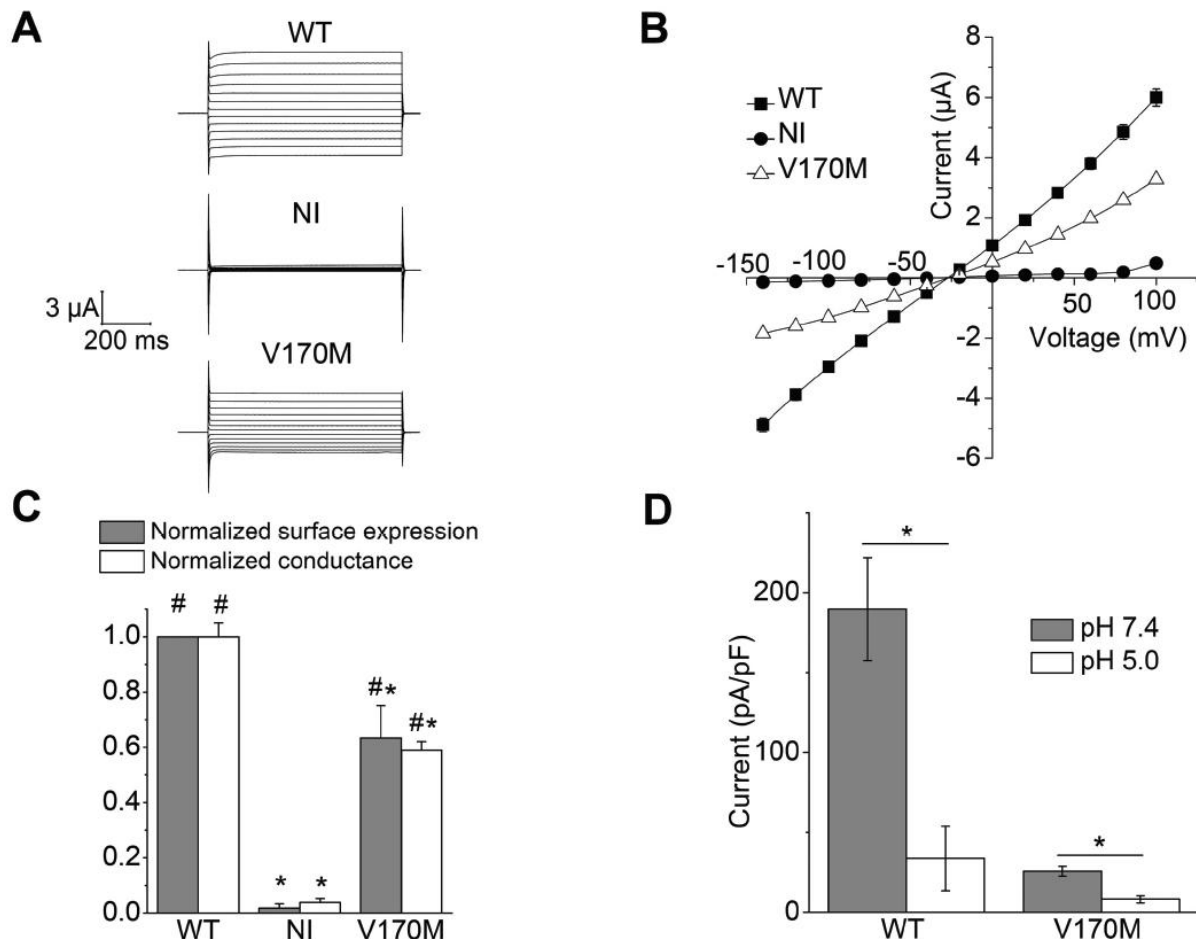
- Birkenhager R, Otto E, Schurmann MJ, Vollmer M, Ruf EM, Maier-Lutz I, Beekmann F, Fekete A, Omran H, Feldmann D et al (2001) Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nat Genet* 29(3): 310-314
- Brochard K, Boyer O, Blanchard A, Loirat C, Niaudet P, Macher MA, Deschenes G, Bensman A, Decramer S, Cochat P et al (2009) Phenotype-genotype correlation in antenatal and neonatal variants of Bartter syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 24(5): 1455-1464
- Chen TY (2005) Structure and function of clc channels. *Annu Rev Physiol* 67: 809-839
- Corpet F (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 16(22): 10881-10890
- Dutzler R, Campbell EB, MacKinnon R (2003) Gating the selectivity filter in CLC chloride channels. *Science* 300(5616): 108-112
- Estevez R, Boettger T, Stein V, Birkenhager R, Otto E, Hildebrandt F, Jentsch TJ (2001) Barttin is a Cl<sup>-</sup> channel beta-subunit crucial for renal Cl<sup>-</sup> reabsorption and inner ear K<sup>+</sup> secretion. *Nature* 414(6863): 558-561
- Fahlke C, Fischer M (2010) Physiology and pathophysiology of CLC-K/barttin channels. *Front Physiol* 1: 155
- Feng L, Campbell EB, Hsiung Y, MacKinnon R (2010) Structure of a eukaryotic CLC transporter defines an intermediate state in the transport cycle. *Science* 330(6004): 635-641
- Gradogna A, Babini E, Picollo A, Pusch M (2011) A regulatory calcium-binding site at the subunit interface of CLC-K kidney chloride channels. *J Gen Physiol* 136(3): 311-323
- Hebert SC (2003) Bartter syndrome. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12(5): 527-532
- Honore E, Maingret F, Lazdunski M, Patel AJ (2002) An intracellular proton sensor commands lipid- and mechano-gating of the K<sup>+</sup> channel TREK-1. *EMBO J* 21(12): 2968-2976
- Janssen AG, Scholl U, Domeyer C, Nothmann D, Leinenweber A, Fahlke C (2009) Disease-causing dysfunctions of barttin in Bartter syndrome type IV. *J Am Soc Nephrol* 20(1): 145-153
- Jeck N, Konrad M, Peters M, Weber S, Bonzel KE, Seyberth HW (2000) Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, leading to a mixed Bartter-Gitelman phenotype. *Pediatr Res* 48(6): 754-758
- Jeck N, Schlingmann KP, Reinalter SC, Komhoff M, Peters M, Waldegger S, Seyberth HW (2005) Salt handling in the distal nephron: lessons learned from inherited human disorders. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288(4): R782-795

- Jeck N, Waldegger P, Doroszewicz J, Seyberth H, Waldegger S (2004) A common sequence variation of the CLCNKB gene strongly activates CLC-Kb chloride channel activity. *Kidney Int* 65(1): 190-197
- Jentsch TJ (2008) CLC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 43(1): 3-36
- Konrad M, Vollmer M, Lemmink HH, van den Heuvel LP, Jeck N, Vargas-Poussou R, Lakings A, Ruf R, Deschenes G, Antignac C et al (2000) Mutations in the chloride channel gene CLCNKB as a cause of classic Bartter syndrome. *J Am Soc Nephrol* 11(8): 1449-1459
- Niemeyer MI, Cid LP, Yusef YR, Briones R, Sepulveda FV (2009) Voltage-dependent and -independent titration of specific residues accounts for complex gating of a CLC chloride channel by extracellular protons. *J Physiol* 587(Pt 7): 1387-1400
- Niemeyer MI, Gonzalez-Nilo FD, Zuniga L, Gonzalez W, Cid LP, Sepulveda FV (2007) Neutralization of a single arginine residue gates open a two-pore domain, alkali-activated K<sup>+</sup> channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(2): 666-671
- Peters M, Ermer S, Jeck N, Derst C, Pechmann U, Weber S, Schlingmann KP, Seyberth HW, Waldegger S, Konrad M (2003) Classification and rescue of ROMK mutations underlying hyperprostaglandin E syndrome/antenatal Bartter syndrome. *Kidney Int* 64(3): 923-932
- Piccolo A, Liantonio A, Didonna MP, Elia L, Camerino DC, Pusch M (2004) Molecular determinants of differential pore blocking of kidney CLC-K chloride channels. *EMBO Rep* 5(6): 584-589
- Pusch M (2004) Structural insights into chloride and proton-mediated gating of CLC chloride channels. *Biochemistry* 43(5): 1135-1144
- Rapedius M, Fowler PW, Shang L, Sansom MS, Tucker SJ, Baukrowitz T (2007) H bonding at the helix-bundle crossing controls gating in Kir potassium channels. *Neuron* 55(4): 602-614
- Rapedius M, Haider S, Browne KF, Shang L, Sansom MS, Baukrowitz T, Tucker SJ (2006) Structural and functional analysis of the putative pH sensor in the Kir1.1 (ROMK) potassium channel. *EMBO Rep* 7(6): 611-616
- Rychkov GY, Pusch M, Roberts ML, Jentsch TJ, Bretag AH (1998) Permeation and block of the skeletal muscle chloride channel, CLC-1, by foreign anions. *J Gen Physiol* 111(5): 653-665
- Sali A, Blundell TL (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 234(3): 779-815
- Schurman SJ, Perlman SA, Sutphen R, Campos A, Garin EH, Cruz DN, Shoemaker LR (2001) Genotype/phenotype observations in African Americans with Bartter syndrome. *J Pediatr* 139(1): 105-110
- Simon DB, Bindra RS, Mansfield TA, Nelson-Williams C, Mendonca E, Stone R, Schurman S, Nayir A, Alpay H, Bakkaloglu A et al (1997) Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nat Genet* 17(2): 171-178

- Starremans PG, Kersten FF, Knoers NV, van den Heuvel LP, Bindels RJ (2003) Mutations in the human Na-K-2Cl cotransporter (NKCC2) identified in Bartter syndrome type I consistently result in nonfunctional transporters. *J Am Soc Nephrol* 14(6): 1419-1426
- Thompson AN, Posson DJ, Parsa PV, Nimigean CM (2008) Molecular mechanism of pH sensing in KcsA potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(19): 6900-6905
- Trapani JG, Korn SJ (2003) Effect of external pH on activation of the Kv1.5 potassium channel. *Biophys J* 84(1): 195-204
- Traverso S, Elia L, Pusch M (2003) Gating competence of constitutively open CLC-0 mutants revealed by the interaction with a small organic Inhibitor. *J Gen Physiol* 122(3): 295-306
- Traverso S, Zifarelli G, Aiello R, Pusch M (2006) Proton sensing of CLC-0 mutant E166D. *J Gen Physiol* 127(1): 51-65
- Uchida S, Sasaki S, Nitta K, Uchida K, Horita S, Nihei H, Marumo F (1995) Localization and functional characterization of rat kidney-specific chloride channel, CLC-K1. *J Clin Invest* 95(1): 104-113
- Unwin RJ, Capasso G (2006) Bartter's and Gitelman's syndromes: their relationship to the actions of loop and thiazide diuretics. *Curr Opin Pharmacol* 6(2): 208-213
- Vargas-Poussou R, Dahan K, Kahila D, Venisse A, Riveira-Munoz E, Debaix H, Grisart B, Bridoux F, Unwin R, Moulin B et al (2011) Spectrum of mutations in Gitelman syndrome. *J Am Soc Nephrol* 22(4): 693-703
- Waldegger S, Jeck N, Barth P, Peters M, Vitzthum H, Wolf K, Kurtz A, Konrad M, Seyberth HW (2002) Barttin increases surface expression and changes current properties of CLC-K channels. *Pflugers Arch* 444(3): 411-418
- Waldegger S, Jentsch TJ (2000) Functional and structural analysis of CLC-K chloride channels involved in renal disease. *J Biol Chem* 275(32): 24527-24533
- Yusef YR, Zuniga L, Catalan M, Niemeyer MI, Cid LP, Sepulveda FV (2006) Removal of gating in voltage-dependent CLC-2 chloride channel by point mutations affecting the pore and C-terminus CBS-2 domain. *J Physiol* 572(Pt 1): 173-181
- Zelikovic I, Szargel R, Hawash A, Labay V, Hatib I, Cohen N, Nakhoul F (2003) A novel mutation in the chloride channel gene, CLCNKB, as a cause of Gitelman and Bartter syndromes. *Kidney Int* 63(1): 24-32
- Zerangue N, Schwappach B, Jan YN, Jan LY (1999) A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* 22(3): 537-548

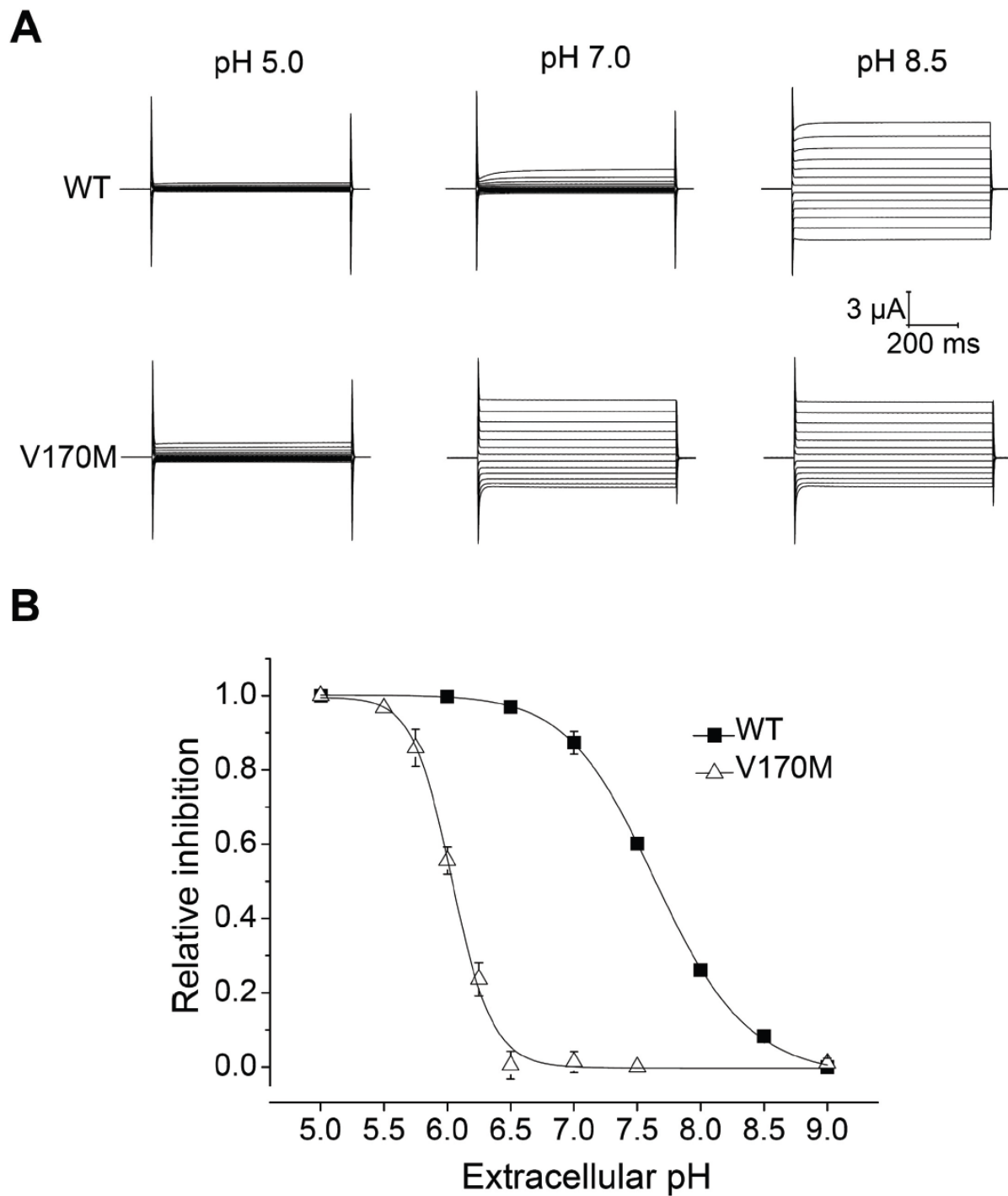


## FIGURES, TABLES AND LEGENDS



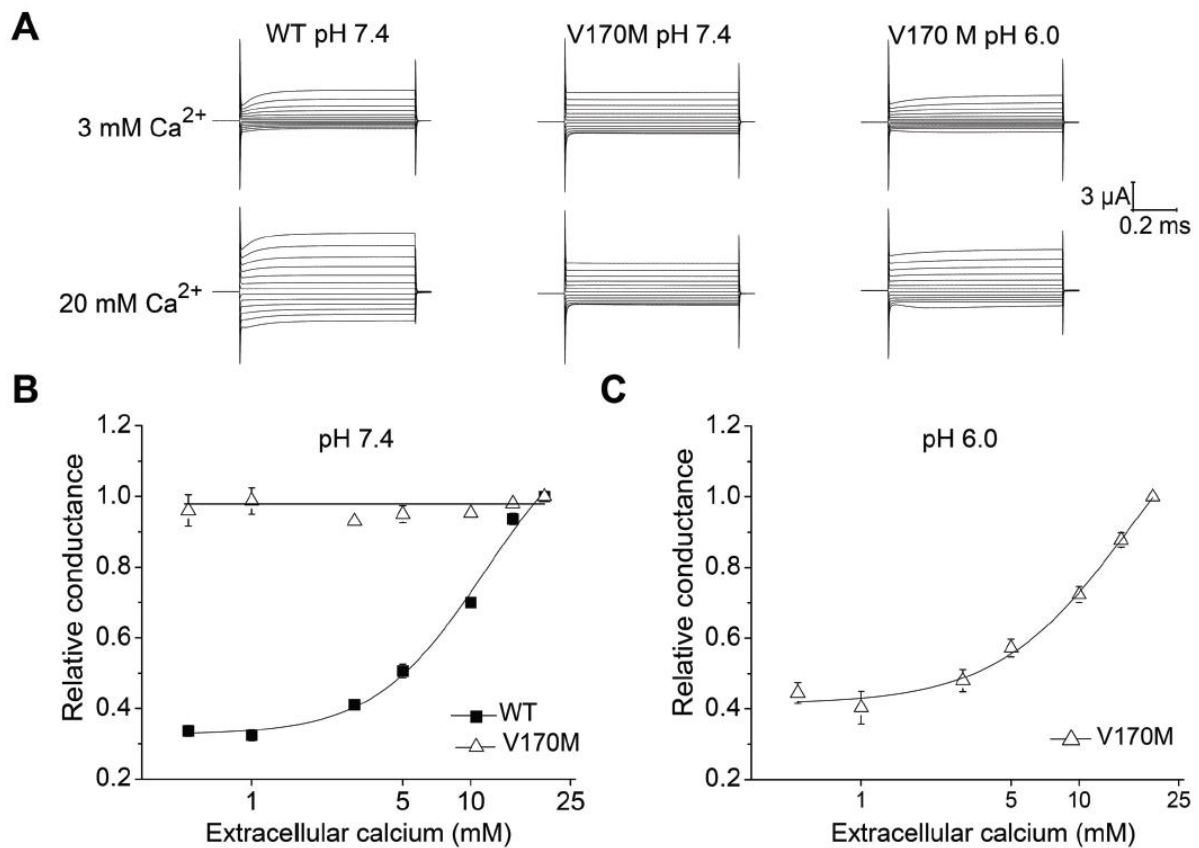
**Figure 1**

**Figure 1. Decreased function in V170M CIC-Kb.** **A.** Representative voltage-clamp recordings obtained from non-injected oocytes (NI) and oocytes expressing wild-type (WT) or V170M CIC-Kb together with Barttin. **B.** Steady-state current-voltage relationships obtained in ND96 solution (3 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 8.5). Each data point represents the mean for at least 6 oocytes from 2 different oocyte batches; SEM is shown as an error bar when larger than symbols (WT,  $n = 13$ ; V170M,  $n = 8$ ; NI,  $n = 6$ ). **C.** Relative conductance and surface expression. Conductance at +60 mV in ND96 solution (3 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 8.5) was normalized to the mean value for WT CIC-Kb. The number of observations was as in B. Cell surface expression (measured in RLU, Relative Light Units) was expressed relative to the value obtained for WT CIC-Kb in the same batch of oocytes. Each column represents the mean  $\pm$  SEM for 3 (WT, NI) or 5 (V170M) different batches, each comprising at least 60 oocytes. #,  $P < 0.05$ , the difference between WT or V170M vs. non-injected oocytes. \*,  $P < 0.05$ , the difference between NI or V170M vs. WT CIC-Kb. **D.** Whole-cell current recording from HEK 293 transfected cells coexpressing WT or V170M CIC-Kb with Barttin. The histogram shows the current densities at -120 mV at pH 7.4 and 5.0 (WT,  $n = 11$ ; V170M,  $n = 7$ ). \*,  $P < 0.01$ , the difference between the currents at pH 7.4 vs. pH 5.0.



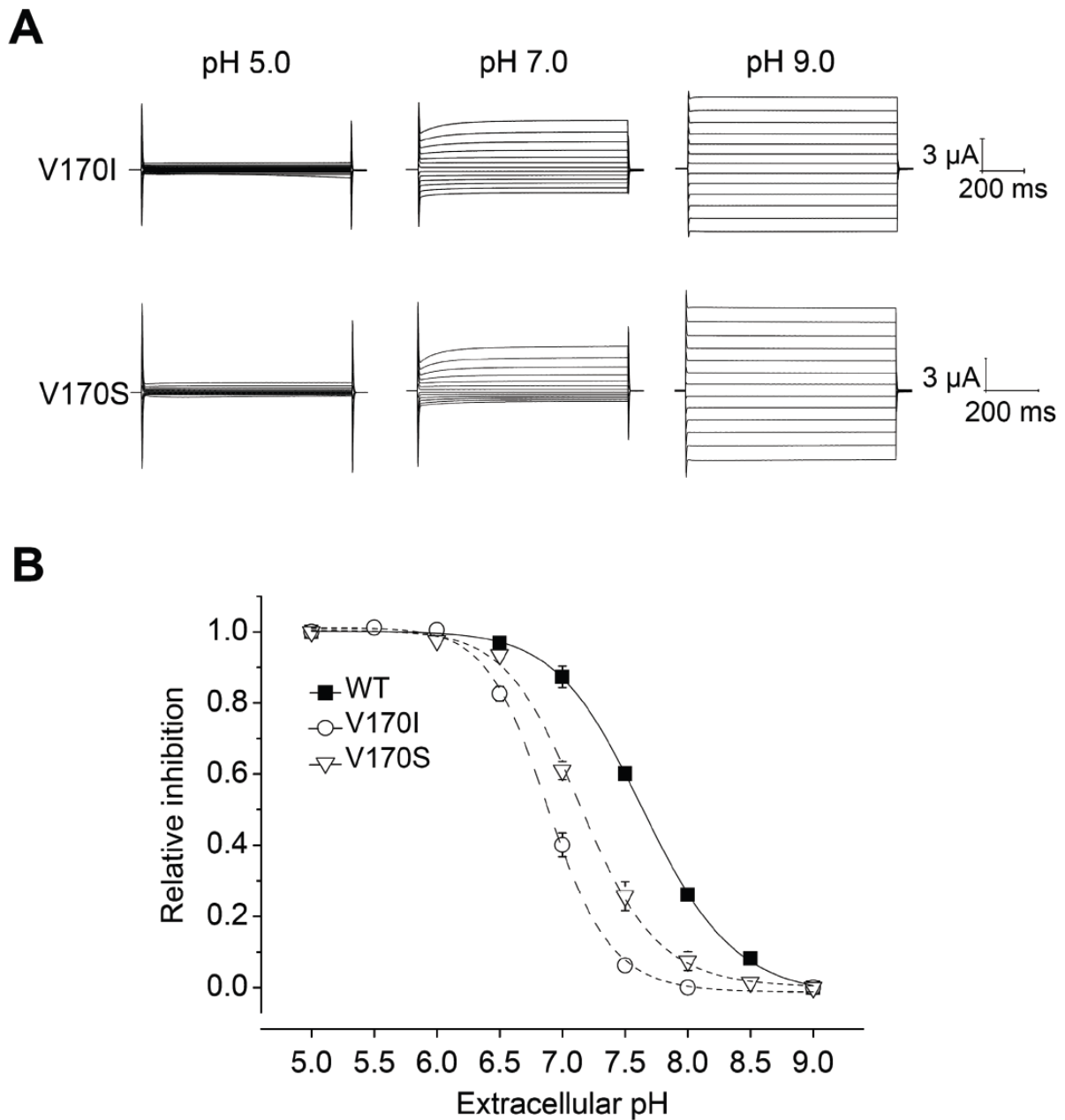
**Figure 2**

**Figure 2. Dependence upon external pH.** **A.** Voltage-clamp traces of WT and V170M ClC-Kb measured at different pH values as indicated, 3 mM  $[Ca^{2+}]_e$ . **B.** Conductance inhibition as a function of external pH for WT and V170M. The pH-sensitive part of  $G_{+60\text{ mV}}$  is expressed as a function of the maximal pH-sensitive  $G_{+60\text{ mV}}$  (as measured at 9.0). Each data point represents the mean of 31 (WT) or 8 (V170M) measurements; SEM is shown as error bar when larger than symbols. The lines represent the best fits to data means obtained using Eq. 1 as described in Methods. The experiments were done in the presence of 3 mM  $Ca^{2+}$  (WT,  $n = 31$ ; V170M,  $n = 8$ ).



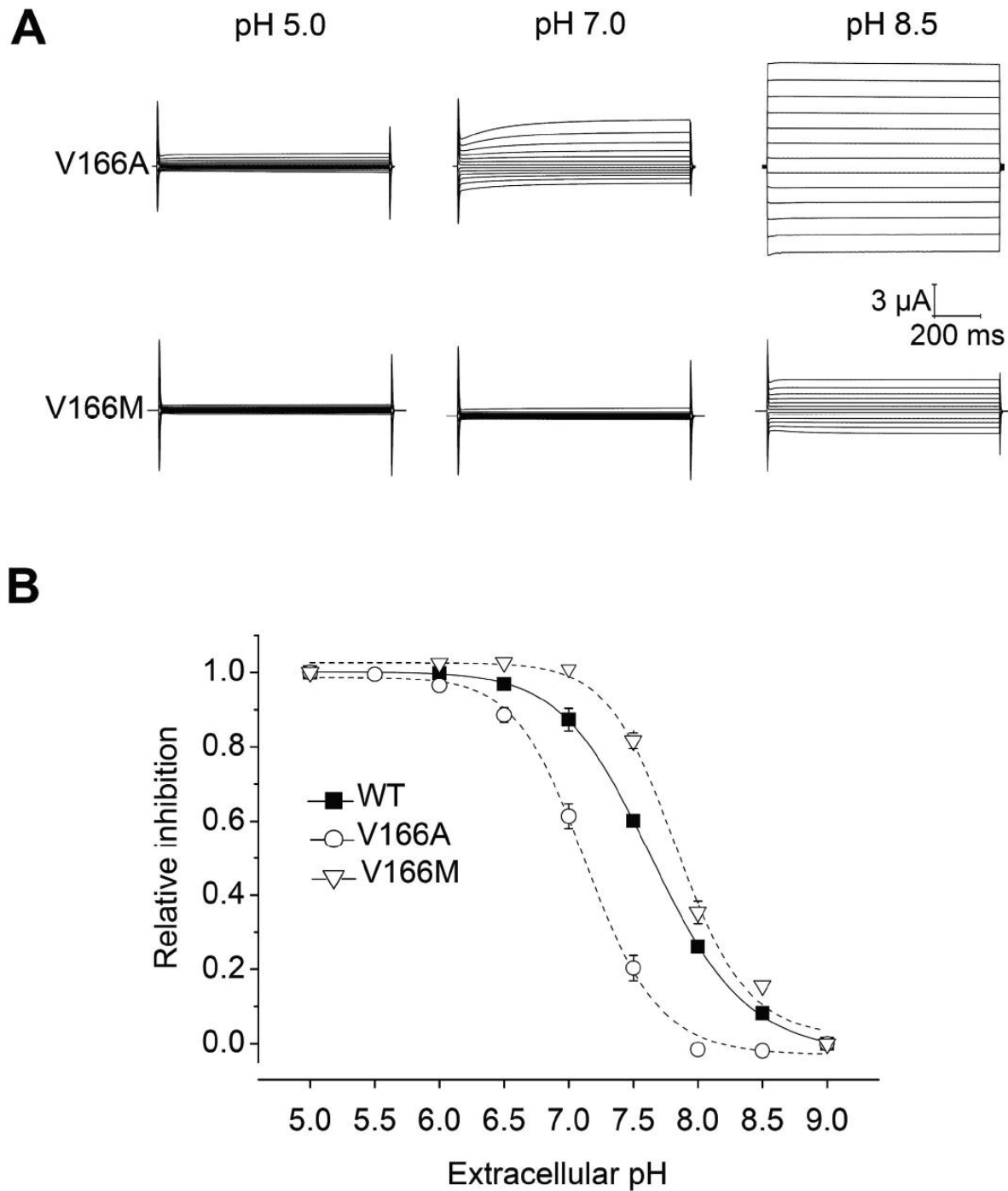
**Figure 3**

**Figure 3. Dependence upon external  $\text{Ca}^{2+}$ .** **A.** Typical current traces of WT and V170M at two  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations as indicated. **B.** Stimulatory effect of  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  on  $G_{+60 \text{ mV}}$  of WT and V170M CIC-Kb measured at pH 7.4. (WT,  $n = 17$ ; V170M,  $n = 14$ ). **C.** For V170M, the stimulatory effect of  $\text{Ca}^{2+}$  is revealed when measured at pH 6.0 ( $n = 6$ ). In B and C, the increase in  $G_{+60 \text{ mV}}$  mV is expressed relative to the values measured in the presence of 20 mM  $\text{Ca}^{2+}$  and plotted versus  $[\text{Ca}^{2+}]_e$ . In B and C, SEM is shown as an error bar when larger than symbols.



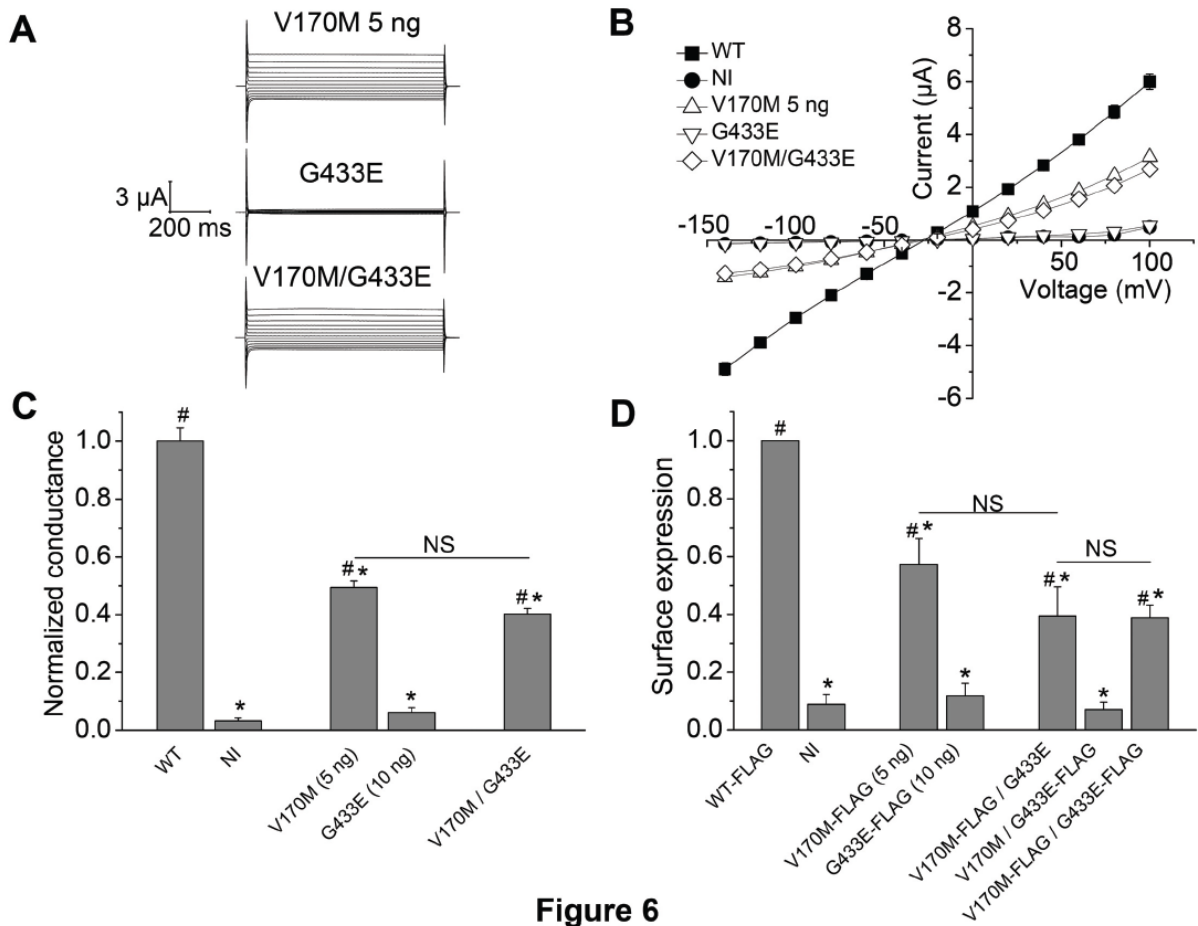
**Figure 4**

**Figure 4. Effects of additional mutations at position 170 on sensitivity to external pH.** **A.** Voltage-clamp traces of V170I and V170S CIC-Kb measured at different pH as indicated in the presence of 3mM  $[\text{Ca}^{2+}]_e$ . **B.** The inhibition of  $G_{+60 \text{ mV}}$  is plotted as a function of external pH for WT, V170S and V170I in the presence of 3mM  $\text{Ca}^{2+}$  (WT,  $n = 31$ ; V170I,  $n = 8$ ; V170S,  $n = 6$ ). SEM is shown as an error bar when larger than symbols. The lines represent the best fits obtained using Eq. 1 as described in Material and Methods.



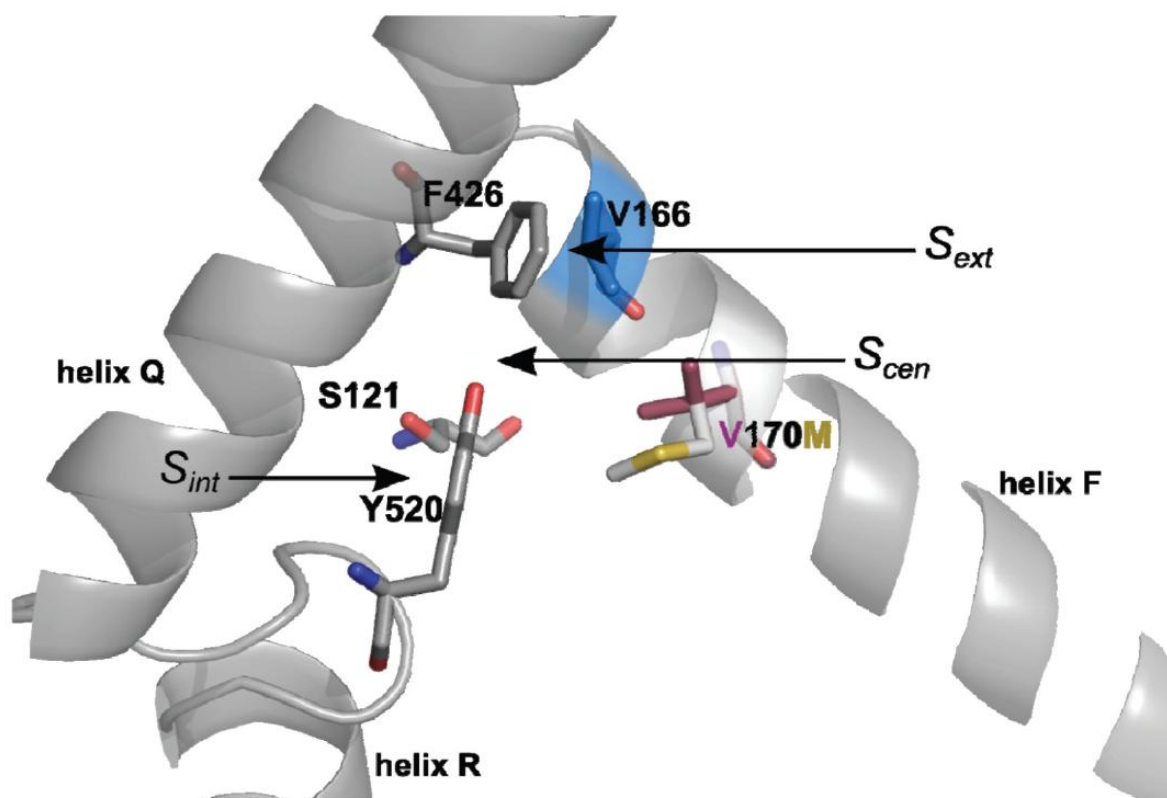
**Figure 5**

**Figure 5. Effect of mutating Val 166 on sensitivity to external pH.** **A.** Voltage-clamp traces of V166A and V166M at different pH values as indicated. **B.** The pH-sensitive part of  $G_{+60 \text{ mV}}$  is expressed as a function of the maximal pH-sensitive  $G_{+60 \text{ mV}}$  (as measured at pH 9.0). The experiments were done in the presence of 3mM  $\text{Ca}^{2+}$  (WT,  $n = 31$ ; V166A,  $n = 8$ ; V166M,  $n = 8$ ). SEM is shown as an error bar when larger than symbols. The lines represent the best fits obtained using Eq. 1 as described in Material and Methods.



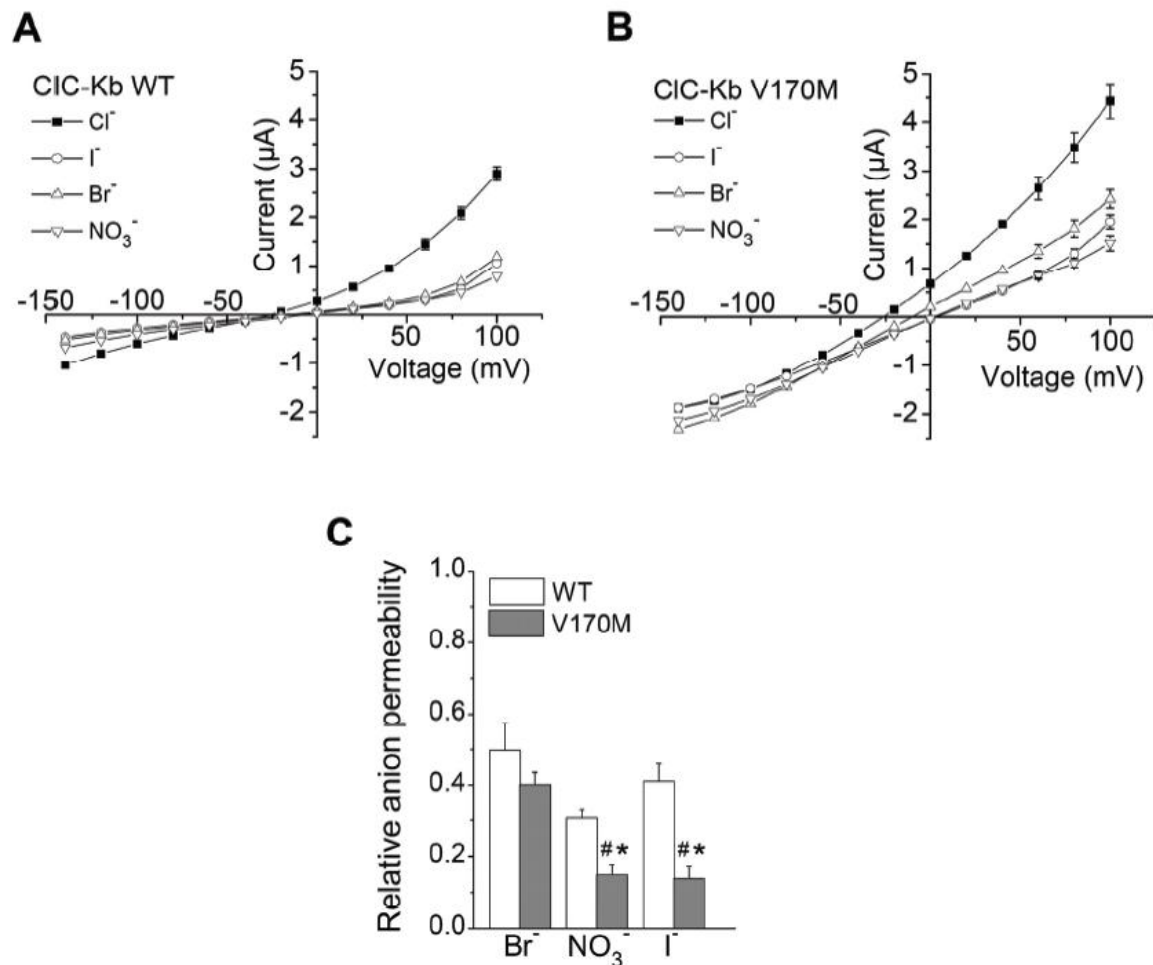
**Figure 6**

**Figure 6. Conductance and surface expression of V170M and G433E mutants expressed in combination in *Xenopus laevis* oocytes.** **A.** Representative voltage-clamp recordings obtained from oocytes expressing V170M (5 ng/ $\mu$ l cRNA/oocyte), G433E (10 ng/ $\mu$ l cRNA/oocyte) and V170M / G433E (5 ng/ $\mu$ l cRNA/oocyte each). **B.** Steady-state current-voltage relationships obtained in ND96 solution (20 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 9.0) from oocytes expressing wild-type (WT), V170M (5 ng/ $\mu$ l cRNA/oocyte), G433E (10 ng/ $\mu$ l cRNA/oocyte) and V170M/G433E (5 ng/ $\mu$ l cRNA/oocyte each) or from non-injected oocytes (NI). Each data point represents the mean of 8-18 measurements (WT,  $n = 18$ ; V170M,  $n = 8$ , G433E,  $n = 8$ , V170M/G433E,  $n = 8$ ; NI,  $n = 8$ ). SEM is shown as an error bar when larger than symbols. **C.** Relative conductance. Conductance at +60 mV in ND96 solution (20 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 9.0) was normalized to the mean value for WT CIC-Kb ( $n = 8$  except for WT,  $n = 18$ ). **D.** Cell surface expression (measured in RLU, Relative Light Units) was expressed relative to the value obtained for WT CIC-Kb in the same batch of oocytes. Each column represents the mean  $\pm$  SEM for 3 different batches comprising at least 60 oocytes. In C and D, #,  $P < 0.05$  represents the difference vs. non-injected oocytes and \*,  $P < 0.05$ , the difference vs. WT CIC-Kb. There was no statistical difference between the currents and surface expressions found for V170M and V170M/G433E (NS).



**Figure 7**

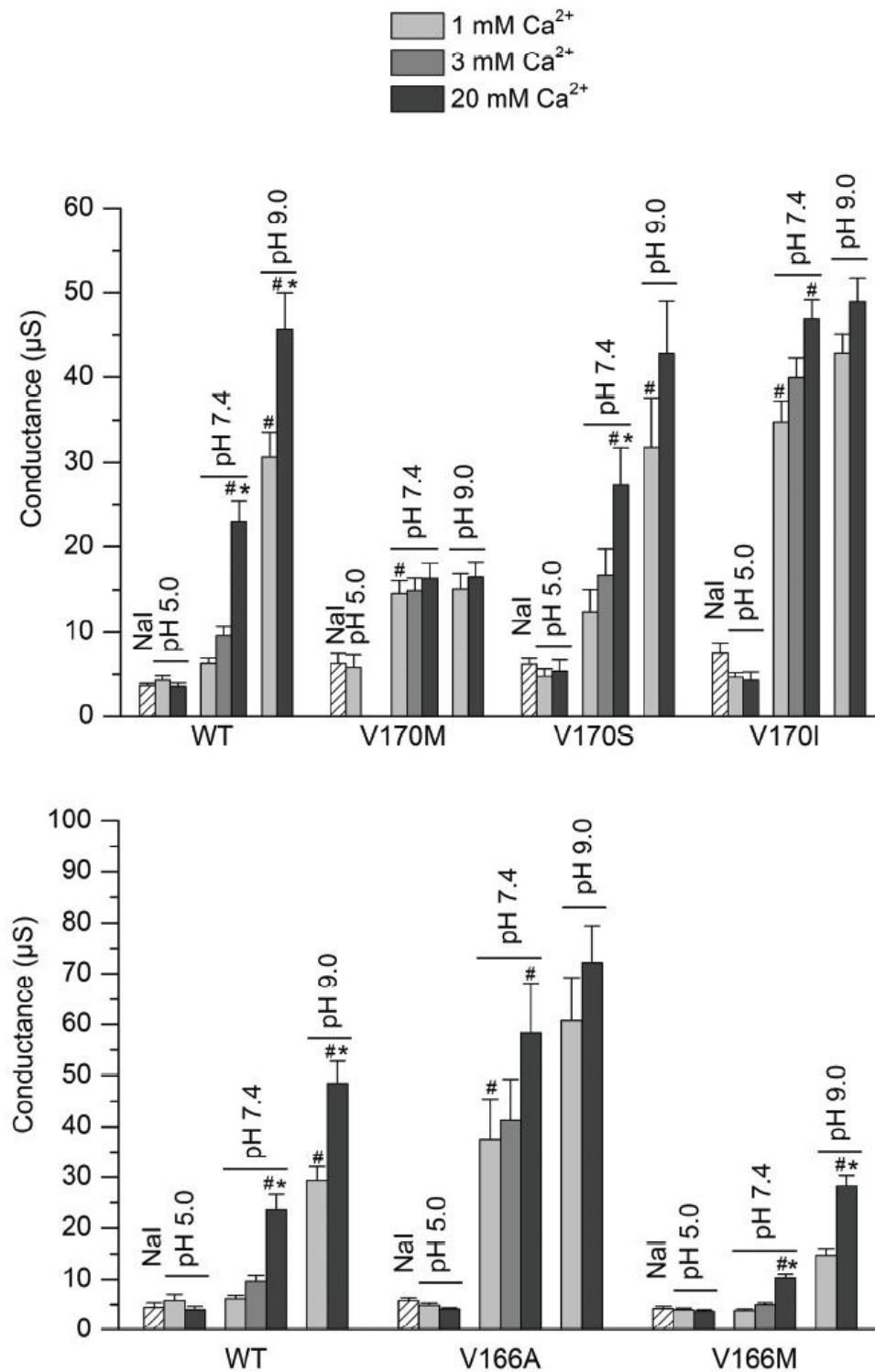
**Fig. 7. Location of Val 170.** The figure shows the molecular context of V170 in the selectivity filter of a homology model of CLC-Kb. Helices F, Q, and R of CLC are shown in a semi-transparent cartoon representation and colored gray. The location of the selectivity filter sites  $S_{ext}$ ,  $S_{cen}$  and  $S_{int}$  are indicated with black arrows. Amino acids of the selectivity filter S121, F426, and Y520 are shown as rods. Blue rods correspond to V166, the equivalent to the E-gating of ec-CLC. V170 is shown in raspberry red, and an overlay of its mutant V170M is shown in white (carbons) and yellow (sulfur).



**Supplementary Figure 1**

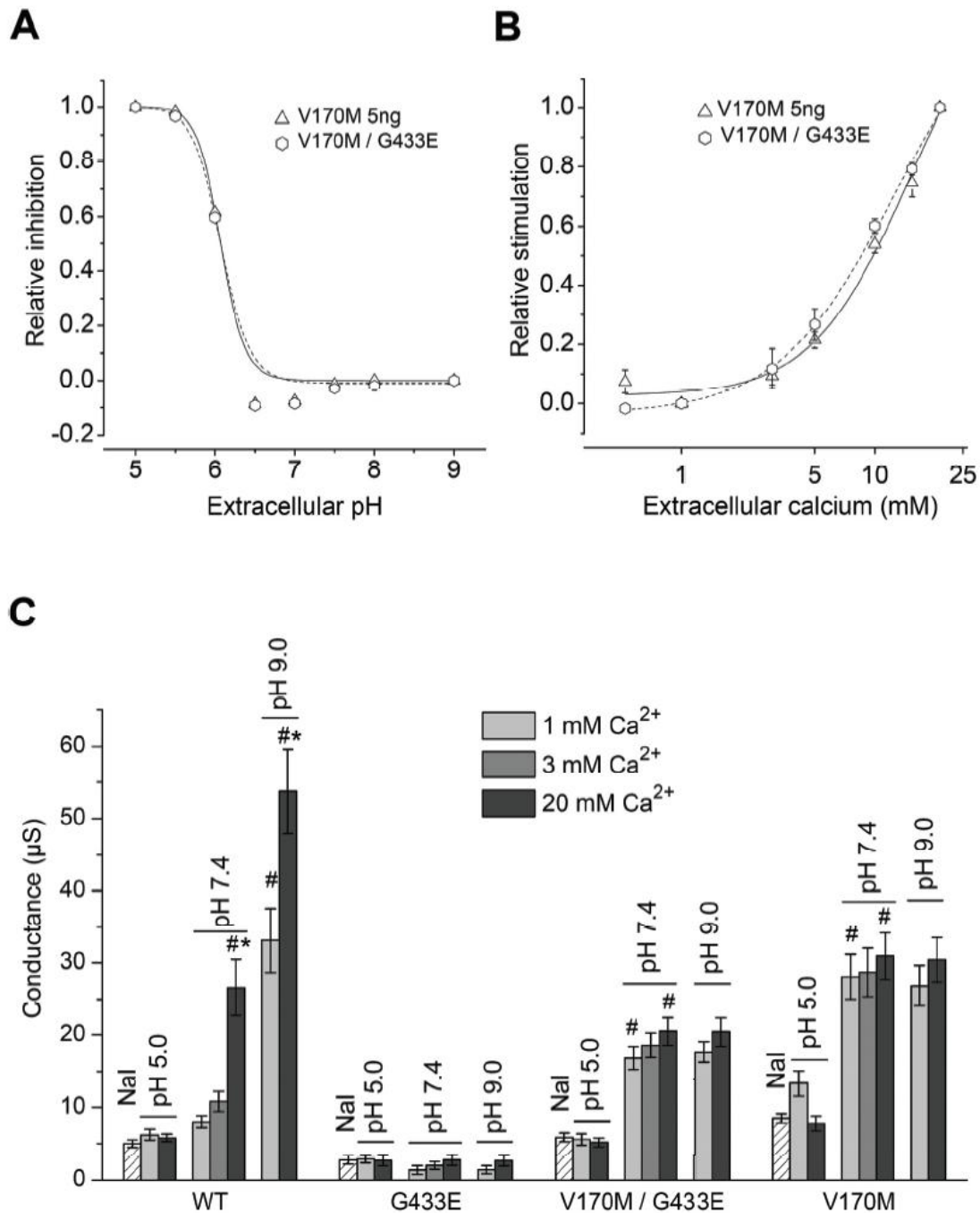
**Supplementary Fig. 1. Anion selectivity of WT and mutant CIC-Kb. A and B.** Current-voltage relationships for WT (A) and V170M (B) CIC-Kb obtained in the presence of  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$  and  $\text{NO}_3^-$ . 80 mM NaCl was replaced by a salt of the test anion in  $\text{Cl}^-$ -substituted solutions. Each data point represents the mean of 6-7 measurements; SEM is shown as an error bar when larger than symbols. **C.** Relative anion permeabilities deduced from the measurements shown in A and B (see Methods). \* indicates statistical difference for the relative permeability to one test anion between WT and V170M ( $P < 0.01$ ); #, significant difference of relative permeabilities for  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{I}^-$  compared to  $\text{Br}^-$  in the case of V170M ( $P < 0.01$ ). There was no such difference for WT.





**Supplementary Figure 2**

**Supplementary Fig. 2. Conductance at +60 mV ( $G_{+60 \text{ mV}}$ ) under various pH and  $\text{Ca}^{2+}$  conditions for WT and mutant CIC-Kb channels.** Also shown is  $G_{+60 \text{ mV}}$  in the presence of 80mM NaI. # indicates that  $G_{+60 \text{ mV}}$  is statistically different from that at the next lower pH (at the same  $[\text{Ca}^{2+}]$ ); \* indicates that  $G_{+60 \text{ mV}}$  is statistically different from that at the next lower  $[\text{Ca}^{2+}]$  at the same pH.



**Supplementary Figure 3**

**Supplementary Fig. 3. Sensitivity of V170M/ G433E to external pH and  $\text{Ca}^{2+}$ .** **A.** The inhibition of  $G_{+60 \text{ mV}}$  is plotted as a function of external pH for V170M and V170M/G433E in the presence of 3mM  $\text{Ca}^{2+}$  (V170M,  $n = 8$ ; V170M/G433E,  $n = 4$ ). **B.** The relative increase in  $G_{+60 \text{ mV}}$  is plotted as a function of  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  (number of observations: V170M,  $n = 5$ ; V170M/G433E,  $n = 3$ ). In A and B, the lines represent the best fits obtained using Eq. 1 as described in Methods. **C.** The conductance at +60 mV ( $G_{+60 \text{ mV}}$ ) is shown under various pH and  $\text{Ca}^{2+}$  conditions for WT, G433E, V170M/G433E, and V170M, and in the presence of 120mM Nal. # indicates  $G_{+60 \text{ mV}}$  is statistically different from the next lower pH (at the same  $[\text{Ca}^{2+}]$ ; \* indicates that  $G_{+60 \text{ mV}}$  is statistically different from the next lower  $[\text{Ca}^{2+}]$  at the same pH.

**Table 1 Clinical characteristics and mutations detected in the *CLCNKB* gene in patients with Bartter/Gitelman syndrome.**

Patient	BT022	BT218	GT207	GT424	BR118	BR125	BR147	GT428
Sex	F	F	F	F	F	F	F	F
Age at diagnosis (years)	43	24	60	37	33	36	38	37
Clinical presentation	Tetany, cramps	Malaise, tetany	Arrhythmia, chondrocalcinosis	Fortuitous detection of hypokalemia	Tachycardia, cramps	Fatigue, polyuria	Fortuitous detection of hypokalemia	Fortuitous detection of hypokalemia
Plasma laboratory findings								
Na <sup>+</sup> (135-145 mM)	140	141	ND	135	137	141	139	140
K <sup>+</sup> (3.5-4.5 mM)	2.74	2.8	2.9	2.9	2.8	3.1	3.39	2.9
Cl <sup>-</sup> (95-105 mM)	99	97	ND	95	95	100	ND	101
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (22-27 mM)	34	32	ND	36	32	26	25	33
Mg <sup>2+</sup> (0.64-0.90 mM)	1.03	0.77	0.78	0.78	0.8	1.07	0.94	0.95
Renin <sup>#</sup>	0	6.5	4.3	2	2.5	1.7	1.7	>10
Aldosterone <sup>#</sup>	0 <sup>§</sup>	1.2	2.5	4	3.5	3.5	1.4	1.2
Urinary Ca <sup>2+</sup> /creatinine (mmol/mmol)	0.15	0.31	ND	0.49	ND	0.47	0.66	0.30
Nephrocalcinosis / stones	ND	ND	ND	No/No	No/Yes	No/No	No/No	No/No
Mutations								
Nucleotide <sup>§</sup>	c.508G>A <sup>a</sup>	c.508G>A <sup>a</sup>	c.508G>A <sup>a</sup>	c.508G>A <sup>a</sup>	c.508G>A/ c.(?_30)_(*220_?)del <sup>b</sup>	c.508G>A/ c.1928_1929+8del <sup>b</sup>	c.508G>A/ c.708C>A <sup>b</sup>	c.508G>A/ c.1298G>A <sup>b</sup>
Protein	p.Val170Met	p.Val170Met	p.Val170Met	p.Val170Met	p.Val170Met/ whole gene deletion	p.Val170Met/ p.Glu643Glyfs*6	p.Val170Met/ p.Tyr236*	p.Val170Met/ p.Gly433Glu
Exon	6	6	6	6	6/2 to 20	6/18	6/8	6/14
Reference	This study	This study	This study	This study	This study/Simon	This study	This study	This study /Bettinelli 2007

<sup>#</sup>, times above the upper limit for age; <sup>§</sup>, urinary aldosterone 34 µg/24h (normal range: 5-17); <sup>§</sup>, Numbering is according to the cDNA sequence (GenBank : NM\_000085.3). The A of the ATG of the initiator Methionine codon is denoted as nucleotide 1; <sup>a</sup> homozygous; <sup>b</sup> compound heterozygous.

CIC-Kb	$pK_H$	$n_H$
WT	$7.60 \pm 0.05$ (31) #	$1.50 \pm 0.10$ (31) #
V170M	$6.00 \pm 0.11$ (13) *	$2.82 \pm 0.18$ (13) *
V170I	$6.88 \pm 0.08$ (8) *#	$1.78 \pm 0.04$ (8) #
V170S	$7.15 \pm 0.09$ (6) *#	$1.46 \pm 0.08$ (6) #
V166A	$7.15 \pm 0.09$ (7) *#	$1.62 \pm 0.03$ (7) #
V166M	$7.83 \pm 0.08$ (8) § #	$1.67 \pm 0.07$ (8) #

**Table 2. Sensitivity to external pH for wild-type (WT) and mutant CIC-Kb channels.** The conductances were measured under different concentrations of pH (in the presence of 3 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) and individual experiments were best fitted to Hill equation (see Material and Methods section). The numbers in parentheses indicate the number of observations collected from at least two different donor frogs. \* indicates values significantly different from WT; #, values significantly different from V170M and §, value significantly different from V166A ( $P < 0.05$ ).

### 3. Résultats complémentaires

Nous avons également étudié sept autres mutations faux-sens pathogènes du CLC-KB (A204T, A210V, S218N, S232P, G345S, G424R et C626Y), parmi lesquelles seulement une a été rapportée précédemment et étudiée fonctionnellement (Simon et al. 1997 ; Waldegger et al. 2000). Parmi ces sept mutations, on trouve une mutation homozygote (A210V) et six mutations hétérozygotes composites (A204T/G424R, S218N/G345S, S232P/C626Y). Ces mutations ont été isolées par les docteurs Rosa Vargas-Poussou et Anne Blanchard (Département de génétique, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris). Nous nous sommes attachés à décrire ces nouveaux mutants d'un point de vue fonctionnel dans les ovocytes de xénope afin de déterminer leur impact sur les courants, l'adressage membranaire et les régulations par le pH et le calcium externes.

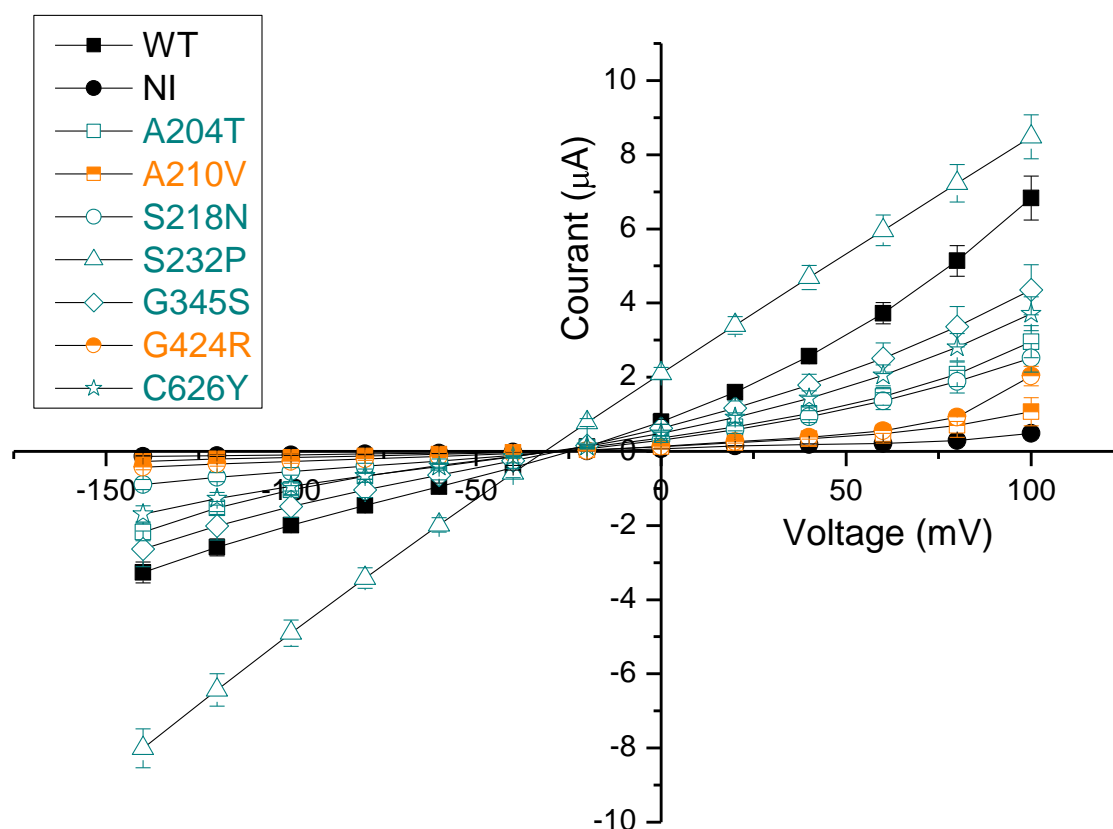


Figure 19 : courbes courant-voltage enregistrées à partir d'ovocytes baignés dans une solution de ND96 à 20mM de  $\text{Ca}^{2+}$  pH7,4. Chaque point représente la moyenne d'au moins 8 ovocytes issus de 3 lots différents.

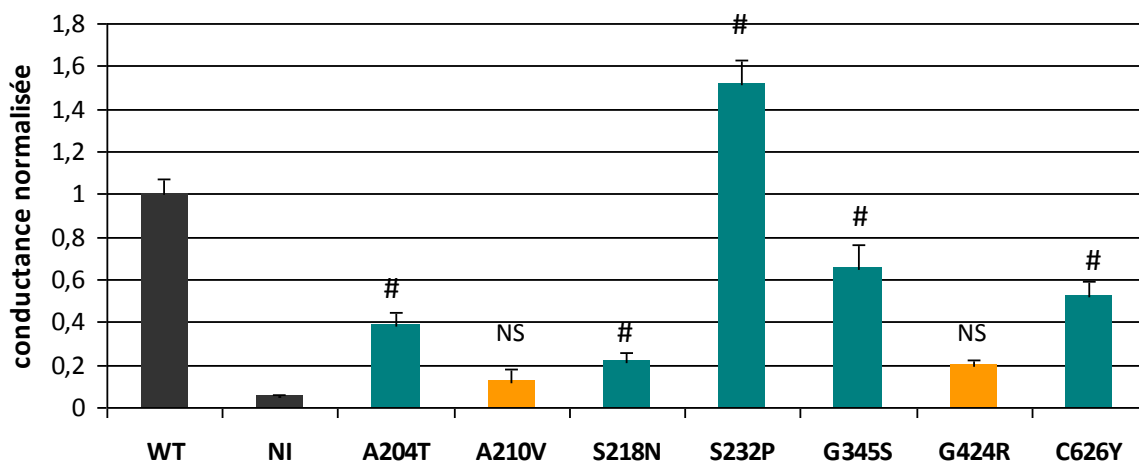
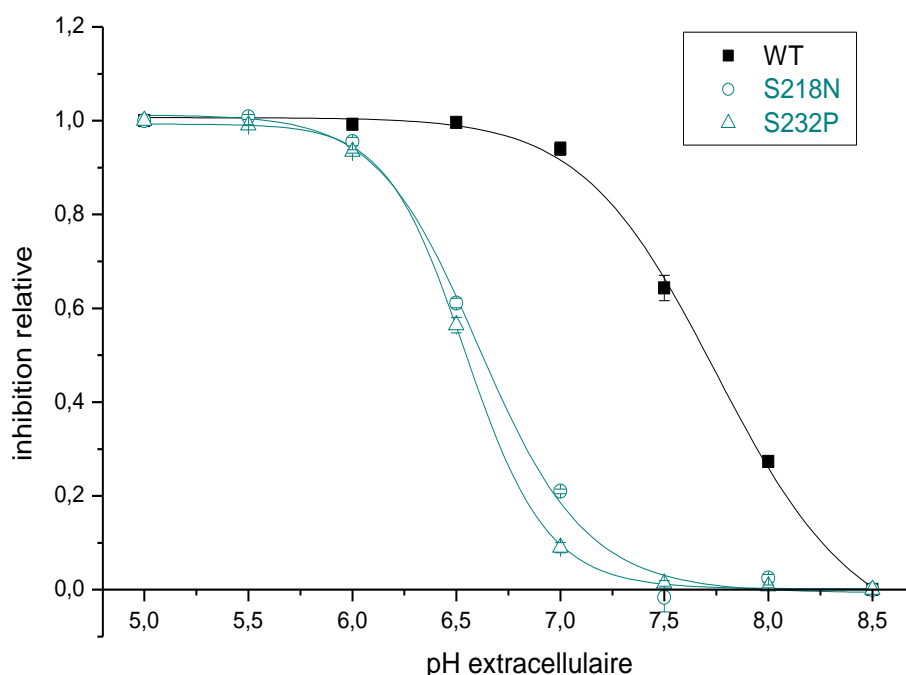


Figure 20 : conductances à +60mV normalisées calculées à partir d'enregistrements d'ovocytes baignant dans une solution de ND96 à 20mM de  $\text{Ca}^{2+}$  pH7,4. Chaque point représente la moyenne d'au moins 8 ovocytes issus de 3 lots différents.

# :  $p < 0,05$  différences versus NI (tous les mutants sont statistiquement différents du WT).

Nos données démontrent que les courants et les conductances portés par quatre mutations (A204T, S218N, G345S et C626Y) diminuent de 40 à 80% par rapport au CLC-KB sauvage, tandis que la mutation S232P entraîne une augmentation d'environ 50% du courant et de la conductance [voir Figures 19 et 20]. En revanche, les deux mutations A210V et G424R ne laissent subsister aucune activité électrique : le niveau de production de courant qu'elles engendrent n'est pas significativement différent de celui produit par les ovocytes non injectés [voir Figures 19 et 20].

À l'aide de la technique de luminescence, nous avons démontré que les mutants A204T et C626Y diminuent l'expression à la membrane plasmique de façon proportionnelle à la diminution de conductance (50-60%) [données non montrées]. En revanche, les mutants A210V et G424R ne sont pas exprimés à la membrane plasmique [données non montrées]. L'expression à la membrane plasmique des mutations S218N, S232P et G345S n'a pu être étudiée de façon rigoureuse car l'étiquette FLAG semble interférer avec ces mutations dans l'adressage membranaire du canal.



**Figure 21 :** inhibition relative de la conductance à +60mV en fonction du pH externe. Chaque point représente la moyenne d'au moins 8 ovocytes issus de 3 lots différents.

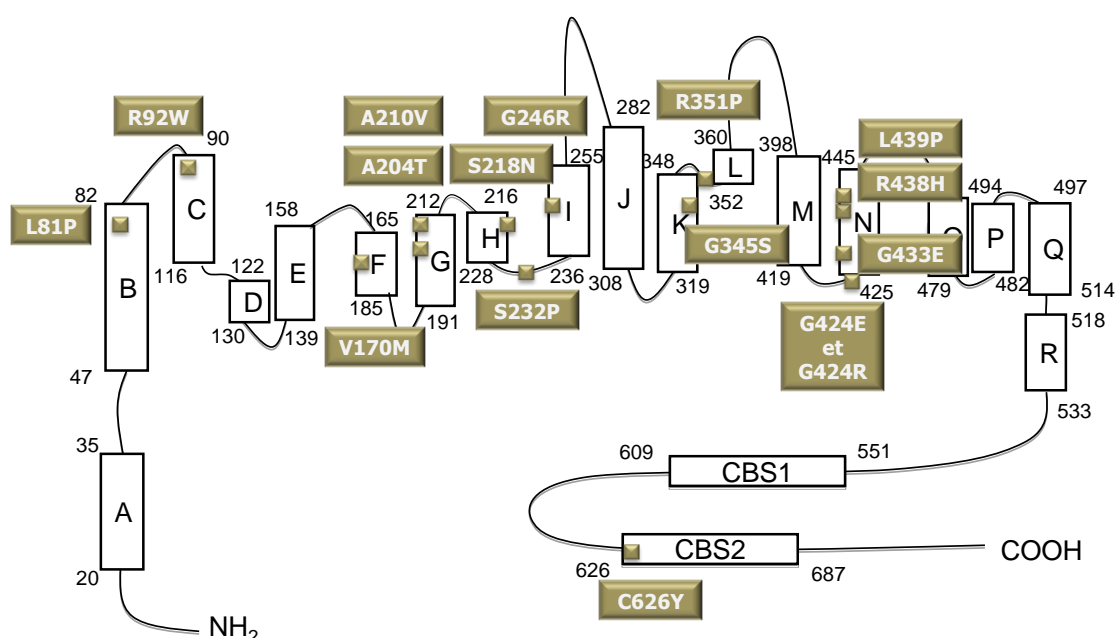
Nous avons ensuite analysé la sensibilité au pH et au calcium extracellulaires des cinq mutants qui laissent subsister un courant résiduel de CLC-KB. Seules les mutations S218N et S232P altèrent profondément la sensibilité des canaux au pH et au calcium extracellulaires. En effet, le  $pK_H$  se déplace vers une valeur acide ( $6,62 \pm 0,03$  pour S218N et  $6,55 \pm 0,01$  pour S232P) comparé à celle du CLC-KB sauvage ( $7,77 \pm 0,05$ ) [voir Figure 21]. De plus, à l'instar de la mutation V170M, ces deux mutations sont insensibles au calcium extracellulaire à pH 7,4 [données non montrées]. En revanche, elles retrouvent cette sensibilité à pH 6,0 [données non montrées]. Les mutations S218N et S232P n'entraînent donc pas la suppression de la sensibilité au calcium externe mais altèrent spécifiquement la sensibilité au pH externe. En revanche, les mutations A204T, G345S et C626Y ne modifient pas les sensibilités au pH et au calcium extracellulaires [données non montrées].

La mutation A204T, déjà publiée, est une mutation fréquente dont le tableau clinique est très variable, allant de très sévère à léger (Simon et al. 1997). Chez CLC-1, des mutations artificielles dans cette région provoquent des modifications profondes de la dépendance au voltage (Duffield et al. 2003). Cependant, nous constatons que la mutation n'induit pas d'altération de la sensibilité au pH et au calcium externes. À l'inverse, les mutations S218N et S232P modifient la sensibilité au pH externe du canal CLC-KB, de façon similaire à ce que nous avons observé pour la mutation V170M.

## DISCUSSION

Au cours de ce travail, nous avons analysé les conséquences fonctionnelles et cliniques de différentes mutations du canal CLC-KB rapportées chez des patients diagnostiqués pour un syndrome de Bartter et/ou Gitelman. Nous avons analysé 16 mutations pathogènes [voir Figure 22] :

- sept mutations (44%) causent une abolition totale du courant et de l'expression à la membrane plasmique (A210V, G246R, G424E, G424R, G433E, R438H et L439P).
- huit mutations (50%) diminuent le courant résiduel et l'adressage à la membrane plasmique (L81P, R92W, V170M, A204T, S218N, G345S, R351P et C626Y), à l'exception des mutations S218N et G345S qui n'ont pu être étudiées par luminescence.
- enfin, une mutation très particulière (S232P) entraîne une augmentation du courant par rapport au canal sauvage. L'expression à la membrane plasmique de cette dernière mutation n'a également pu être étudiée par luminescence.



**Figure 22 :** localisation au niveau d'un monomère CLC-KB des mutations pathogènes analysées dans les deux publications présentées et les résultats complémentaires.



## La réduction de l'expression membranaire du CLC-KB est la conséquence majeure des mutations du gène *CLCNKB*.

Nos études montrent qu'une altération de l'expression à la membrane plasmique est le défaut fonctionnel majeur induit par les mutations pathogènes du CLC-KB. Cette observation contraste avec les études fonctionnelles de mutations du CLC-1 et du CLC-5 (Pusch et al. 1995 ; Lossin et al. 2008 ; Lourdel et al. 2012).

En effet, les mutations pathogènes du CLC-1 induisant une myotonie altèrent plus souvent la conductance et le gating du canal que l'expression à la membrane plasmique (Pusch et al. 1995 ; Lossin et al. 2008). Dans le cas du CLC-5, 20% des mutations semblent ne pas modifier l'adressage mais altèrent le gating (Lourdel et al. 2012). En revanche, toutes les mutations du CLC-KB que nous avons analysées par luminescence altèrent l'expression à la membrane plasmique. Seulement trois mutations sur les seize étudiées (soit 19%) affectent le gating (V170M, S218N et S232P) et également l'expression à la membrane plasmique (V170M).

Par ailleurs, les mutations du CLC-5 causant une réduction totale du courant et de l'expression membranaire (environ 60% des mutants contre 44% pour CLC-KB) sont généralement localisées à l'interface entre les deux monomères et, de ce fait, déstabilisent la dimérisation (Lourdel et al. 2012). Or, nous n'avons observé qu'un seul cas similaire pour les mutations du CLC-KB. Il s'agit de la mutation G246R, localisée au sein de l'hélice I impliquée dans l'interface entre les deux monomères (Duffield et al. 2003 ; Robertson et al. 2010) [voir Figure 22], où l'on peut anticiper que le remplacement d'une glycine neutre en une arginine chargée devrait affecter la structure hélicoïdale de l'hélice I et prévenir la dimérisation du canal.

Comme G246R, les mutations A210V, G424E, G424R, G433E, R438H et L439P abolissent le courant et l'expression à la membrane plasmique du CLC-KB. La mutation A210V est localisée à la fin de l'hélice [voir Figure 22]. Chez CLC-1, des mutations artificielles dans cette région provoquent des modifications profondes de la dépendance au voltage (Duffield et al. 2003). Les mutations G424E et G424R sont positionnées dans un motif participant à la liaison du chlorure au sein du filtre de sélectivité, juste avant l'hélice N (Dutzler et al. 2003) [voir Figure 22]. Plusieurs mutations du CLC-1, entraînant une myotonie, ont été décrites dans la région correspondante aux mutations G424E et G424R du CLC-KB. En effet, (1) la mutation G482R, qui correspond exactement à l'acide aminé 424 du CLC-KB, n'a

pas été analysée fonctionnellement (Meyer-Kleine et al. 1995), (2) les mutations P480L et R496S abolissent les courants dans les ovocytes de xénope (Lorenz et al. 1994 ; Pusch et al. 1995), (3) enfin la mutation M485V entraîne une diminution de la conductance unitaire et une altération du gating (Meyer-Kleine et al. 1995 ; Wollnik et al. 1997). Les mutations G433E, R438H et L439P du CLC-KB sont localisées au sein de l'hélice N [voir Figure 22]. La mutation R438H a précédemment été rapportée mais n'a jamais été analysée fonctionnellement avant cette étude (Konrad et al. 2000 ; Zelikovic et al. 2003). Une autre mutation du CLC-KB à la même position, R438C, entraîne une diminution des courants d'environ 90% comparés aux courants sauvages (Simon et al. 1997 ; Estevez et al. 2001). Cependant, l'expression à la membrane plasmique n'a pas été évaluée. Très proche, la mutation Y432H a également été étudiée, avant la découverte de la barttine, en utilisant une construction hybride du CLC-K1 de rat et du CLC-KB humain (Simon et al. 1997 ; Waldegger et al. 2000). Cette mutation produit de très petits courants. Trois mutations du CLC-7 entraînant une ostéopétrose (G521R, R526Q et R526W), ainsi que deux mutations du CLC-5 causant une maladie de Dent et ne produisant aucun courant (G462V et L469P), ont été localisée au sein de cette même hélice N (Pangrazio et al. 2010 ; Grand et al. 2009 ; Ludwig et al. 2005). La mutation G521R de CLC-7 et la mutation G462V de CLC-5 correspondent exactement à la mutation G433E de CLC-KB. L'ensemble des résultats obtenus pour le CLC-KB, le CLC-5 et le CLC-7 semble indiquer que l'hélice N est très sensible aux changements d'acide aminés et que ces changements entraînent généralement un défaut d'adressage à la membrane plasmique.

Les mutations réduisant partiellement l'adressage membranaire sont assez fréquentes dans le cas du CLC-Kb, 50% contre seulement 20% pour les mutations du CLC-5 causant une maladie de Dent (Lourdel et al. 2012). Les mutations L81P, R92W, A204T, G345S, R351P et C626Y conservent une certaine fonctionnalité : 40 à 60% de courant comparé au canal sauvage. La réduction d'expression à la membrane plasmique semble être la cause majeure/unique expliquant la réduction de fonction car aucune de ces mutations ne modifie la sensibilité au pH et au calcium extracellulaires. La mutation L81P, la seule à être localisée au sein de l'hélice B à laquelle la barttine se lie (Tajima et al. 2007) [voir Figure 22], pourrait déstabiliser l'association du CLC-KB avec la barttine. Enfin, la mutation C626Y est située au début du domaine CBS2. Cependant le rôle des domaines CBS dans l'adressage du CLC-KB reste à déterminer.

## Les mutations altérant la régulation du canal produisent un gain de fonction apparent.

De nombreuses mutations pathogènes de CLC-1 altèrent la conductance unitaire ou la dépendance au voltage du canal sans altérer le trafic vers la membrane plasmique (Duffield et al. 2003). Elles peuvent induire une myotonie de type récessif ou dominant. Dans ce dernier cas, il a été démontré que plusieurs mutations affectent la porte commune (Pusch et al. 2004). La dépendance au voltage est déplacée vers des potentiels plus positifs ce qui a pour conséquence de diminuer l'activité du canal. Pour notre part, dans le cas du CLC-KB, nous avons identifié trois mutations (V170M, S218N et S232P) qui altèrent la sensibilité aux protons du canal et réduisent, au moins partiellement, la sensibilité au calcium externe (l'activité sensible au calcium est maximale dès 1mM de  $\text{Ca}^{2+}$  à pH7,4). La sensibilité au pH est réduite et le canal est maximalelement activé au pH physiologique.

C'est le paradoxe de ces mutations : elles diminuent la perte de fonction résultant d'un adressage membranaire réduit. Trois mutations supplémentaires (P124L, T211A et F213A), non présentées dans ce manuscrit, ont le même effet global. Nous n'avons donc jamais observé une altération de régulation du CLC-KB qui se traduise par une perte de fonction (c'est-à-dire une moindre activité à 1mM de  $\text{Ca}^{2+}$  pH7,4). Des études systématiques devront compléter les nôtres avant de pouvoir conclure que l'on observe dans tous les cas un gain de fonction. En tout état de cause, ceci pose un problème conceptuel bien souligné par le cas de la mutation S232P qui produit un courant supérieur à celui de la molécule sauvage.

Nous pouvons avancer diverses hypothèses. Les mutations ne sont pas pathogènes mais représentent des polymorphismes potentiels. Dans ce cas, il doit exister une autre mutation sur la même protéine ou sur l'une des autres protéines impliquées dans le syndrome de Bartter puisque la maladie est autosomique récessive. Cela est toutefois peu probable au regard du nombre de mutations ayant cette propriété. Il est possible que les systèmes d'expression hétérologue utilisés pour CLC-KB ne soient pas adaptés. Il existe de nombreux travaux montrant que les conséquences fonctionnelles de mutations peuvent dépendre du système d'expression choisi. En outre, l'expression hétérologue du CLC-KB est difficile comparée à celle du CLC-KA (Gradogna et al. 2010 ; données non publiées). Cependant, plus fondamentalement, deux possibilités peuvent être évoquées :

- les régulations par le pH et le calcium extracellulaires ne sont pas les régulations pertinentes physiologiquement. D'autres régulations, qui n'ont pas encore été identifiées, pourraient être plus importantes. On peut alors imaginer que les mutations que nous avons étudiées inhiberaient ces régulations alors qu'elles affranchissent la molécule des régulations par le pH et le calcium externes.
- on peut spéculer que le gain de fonction constaté a, par lui-même, un effet délétère. Le rôle principal du CLC-KB est le transport de chlorure. Dans ce cadre, nous sommes forcés d'admettre que le gain de fonction tend à préserver l'absorption de chlorure. Cependant, le canal est également présent dans la macula densa qui a un rôle de signalisation. À cet endroit, une altération de régulation pourrait induire une mauvaise homéostasie du chlorure intracellulaire. Or, il est probable que la concentration de chlorure intracellulaire fasse partie du système de signalisation. L'hyperactivité d'un canal chlorure placé à cet endroit pourrait entraîner une mauvaise perception d'un chlorure luminal bas et induire, secondairement, un signal de sécrétion de la rénine par les cellules sécrétrices de rénine. Il ne s'agit évidemment que d'une hypothèse que nous envisageons de tester dans un proche futur.

### **Mécanismes hypothétiques de l'altération de la sensibilité au pH :**

Gradogna et al. ont étudié en détail la régulation du CLC-KA par le pH et le calcium extracellulaires. Ces auteurs ont proposé que l'histidine 497 forme le site responsable de l'inhibition des CLC-K par les protons extracellulaires (Gradogna et al. 2010) [voir Figure 23]. Ils ont également identifié le glutamate 261 et l'aspartate 278 comme les sites de liaison du calcium extracellulaire des CLC-K (Gradogna et al. 2010) [voir Figure 24]. Ces acides aminés sont positionnés à l'aspect extérieur de la protéine et sont assez éloignés de la valine 170 et des sérines 218 et 232 [voir Figures 23 et 24]. Il est donc probable que les mutations V170M, S218N et S232P n'altèrent pas directement le site de liaison des protons car elles sont situées à distance des sites proposés. Il est également à noter que les trois mutations ne limitent pas une zone spatialement définie. En effet, même si l'on peut toutefois avancer que la valine 170 et la sérine 218 sont peu éloignées (elles sont plutôt situées sur le côté extérieur de la protéine), la sérine 232 est, quant à elle, localisée à leur opposé (du côté intracellulaire). Cette particularité renforce l'hypothèse de mutations agissant sur la commande du gating plutôt que sur le site sensible aux protons.

## MILIEU EXTRACELLULAIRE

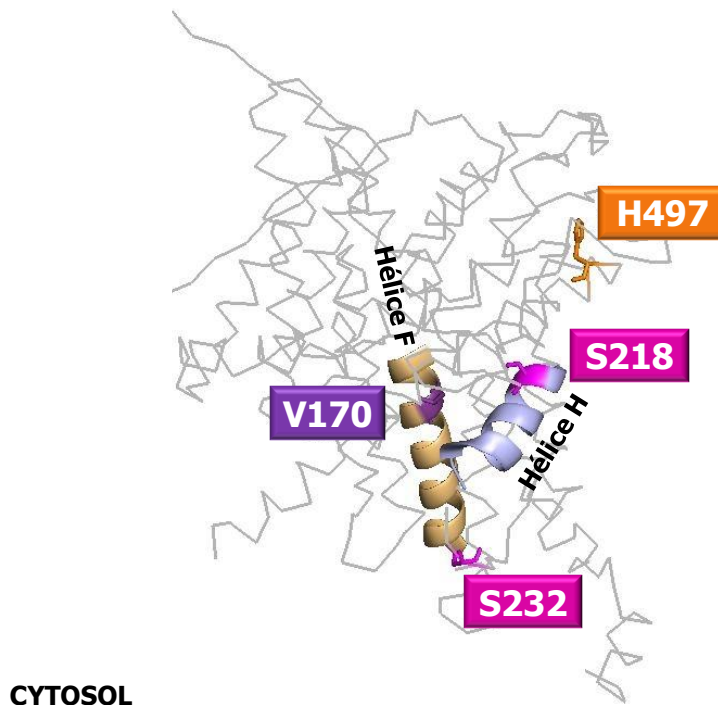


Figure 23 : localisation de la valine 170, des sérines 218 et 232 et de l'histidine 497 (site supposé de liaison des  $H^+$  extracellulaires, Gradogna et al. 2010) sur un modèle 3D du CLC-KB réalisé à partir de la structure d'ecCLC-1.

## MILIEU EXTRACELLULAIRE

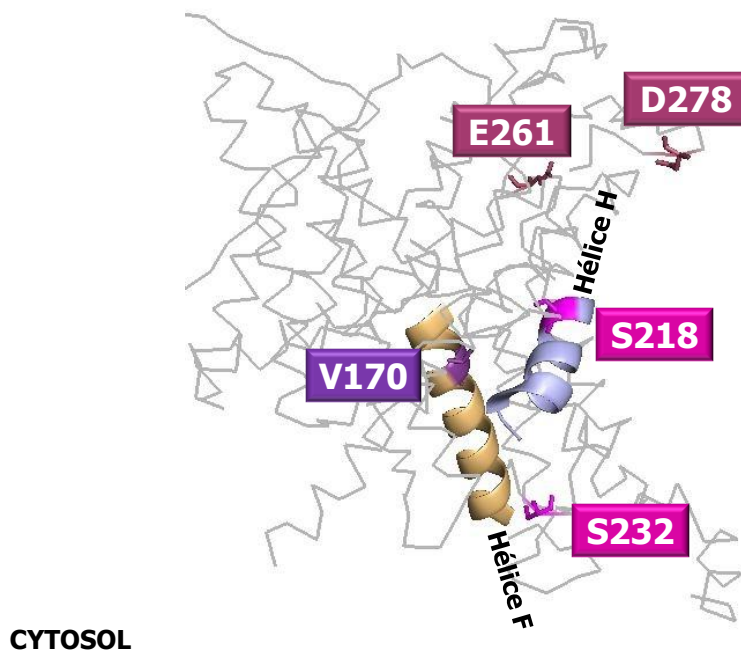


Figure 24 : localisation de la valine 170, des sérines 218 et 232, du glutamate 261 et de l'aspartate 278 (sites supposés de liaison du  $Ca^{2+}$  extracellulaire, Gradogna et al. 2010) sur un modèle 3D du CLC-KB réalisé à partir de la structure d'ecCLC-1.

La valine 170 est localisée sur l'hélice F [voir Figures 23 et 24], une région importante pour la sélectivité et le gating du protonopore de tous les CLC. Elle est conservée chez tous les CLC, à l'exception du CLC-7, mais n'a jamais été étudiée en détail sauf pour le CLC-1 (Fahlke et al. 1997). Le groupe de Fahlke a réalisé une étude systématique de mutations au sein de cette région sur le CLC-1 afin de déterminer les acides aminés importants pour la sélectivité ionique (Fahlke et al. 1997). À cette position, les mutations ont des effets mineurs sur la sélectivité anionique. En revanche, comme nous l'avons déjà mentionné en introduction, les CLC (à l'exception des CLC-K) portent, en position 166, un glutamate qui est très important pour le gating du protonopore. Le glutamate obture partiellement le pore et pivote sous l'effet d'une protonation, libérant ainsi l'accès à un site de coordination pour un ion chlorure. Les mutations du « gating glutamate » sur CLC-0, CLC-1 et CLC-2 altèrent puissamment le gating voltage-dépendant des protonopores (Dutzler et al. 2003 ; Traverso et al. 2006 ; Yusef et al. 2006) mais perturbent également la porte commune. On admet en effet qu'il existe une interaction non identifiée entre le gating du protonopore et le gating commun. Dans le cas du CLC-KB, la mutation de la valine 166 a un effet modéré comparé aux effets des mutations en position 170. En utilisant la structure du CLC bactérien ecCLC-1 pour créer un modèle 3D du CLC-KB, nous avons observé que ces deux valines sont alignées sur l'hélice F et font face au protonopore. Cependant, il semble que la valine 170 soit plus proche du site central de liaison pour le chlorure que la valine 166, expliquant ainsi son importance. Les CLC-K portent une valine à la place du « gating glutamate ». On considère donc que le protonopore des CLC-K ne présente pas de gating voltage-dépendant. Cela ne signifie pas qu'ils n'aient aucun gating. La sensibilité au pH externe pourrait s'exercer au niveau du protonopore, de la porte commune ou des deux.

Deux autres mutations, S218N et S232P, altèrent la sensibilité au pH du CLC-KB. Elles sont situées l'une au début de l'hélice H et l'autre sur la boucle entre les hélices H et I. Spatialement, ceci correspond à une localisation pas/peu éloignée de l'interface entre les monomères. En effet, les hélices H et I participent à l'interface et plusieurs études ont montré que des mutations artificielles du CLC-1 dans cette région entraînaient de profondes conséquences sur le gating, particulièrement sur le gating commun. Les mutations C278S sur CLC-1 (Duffield et al. 2003) et C213S sur CLC-0 (Lin et al. 1999), correspondant à la position 212 du CLC-KB, ont un effet exclusif sur la porte commune. Dans la région 210-230 de CLC-KB, des mutations artificielles du CLC-1 ont une action exclusive sur la porte commune, la

bloquant ouverte ou fermée (Accardi et al. 2001 ; Cederholm et al. 2010). En outre, des mutations pathogènes du CLC-1 à effet dominant, affectant la porte commune et ayant pour résultat de déplacer la courbe de sensibilité au pH vers des potentiels plus positifs, ont été décrites dans cette même région (Pusch et al. 2004). Il est donc raisonnable de penser, en première approximation, que ces mutations altèrent la porte commune.

Nous pouvons alors faire l'hypothèse que le site sensible aux protons agirait en premier lieu sur la porte commune. Les trois mutations auraient donc la même conséquence fonctionnelle : elles rendraient la porte commune moins sensible aux protons en altérant la transmission du gating. Il reste que les canaux peuvent toujours être fermés complètement à pH très acide. Or, on admet généralement que la porte commune de tous les autres CLC ne se ferme pas complètement. Nous pouvons donc spéculer qu'il existe un gating pH-dépendant du protopore moins sensible que le gating commun ou lié à un site indépendant de moindre affinité. Un argument indirect en faveur de cette hypothèse est démontré dans les résultats d'études du CLC-2 (Niemeyer et al. 2009). Ce canal est sensible au pH extracellulaire selon une courbe en cloche : il est activé pour des pH faiblement acides et inhibé pour des pH basiques et très acides. L'équipe de Sepulveda a montré que la mutation du « gating glutamate » supprimait l'activation par les protons en ne laissant subsister qu'une inhibition à pH très acide ( $pK_H \sim 6,2$ ) (Niemeyer et al. 2009). Inversement, la mutation d'une histidine externe supprime l'inhibition par les protons et conserve l'activation due à la présence du « gating glutamate » (Niemeyer et al. 2009). Nous proposons donc que les CLC-K possèdent deux sites de liaison des protons. Un agissant principalement sur la porte commune ( $pK_H \sim 7,7$ ) et l'autre sur la porte du protopore ( $pK_H \sim 6,0-6,5$ ). Une possibilité de tester cette hypothèse résiderait dans la substitution simultanée de la valine 166 en glutamate du CLC-KB (qui remplacerait un des sites inhibiteurs en site activateur) et de l'histidine 497 proposée par l'équipe de Pusch (Gradogna et al. 2010).

Concernant la sensibilité réduite au calcium externe de ces mutants, l'explication la plus simple serait que la dépendance au calcium extracellulaire est préservée mais que les modifications du gating du protopore retentissent sur la porte commune. Comme nous l'avons déjà dit, les mutations du « gating glutamate » (correspondant à la valine 166 du CLC-KB) altèrent profondément le gating des protopores mais aussi la porte commune (Dutzler et al. 2003 ; Traverso et al. 2006 ; Yusef et al. 2006). Un processus similaire, dans le cas de la substitution de la valine 170 en méthionine, peut être suggéré. Ainsi, à pH 7,4 une ouverture

totale des protopores entraînerait une ouverture complète de la porte commune, alors qu'à pH6,0 une fermeture partielle des protores restaurerait le gating de la porte commune et la sensibilité au calcium extracellulaire. Le canal sauvage serait, quand à lui, sensible au calcium du pH6,0 au pH8,5 car le protopore n'y est jamais totalement inhibé ou activé.

### **Correspondance entre phénotype et génotype :**

La présentation clinique du syndrome de Bartter est très variable. Dans le cas de nos études, un phénotype modéré est le plus souvent corrélé aux mesures fonctionnelles. Le patient porteur de la mutation R92W à l'état homozygote et d'une large délétion à l'état hétérozygote a été diagnostiqué à l'âge de 20 ans et présente un syndrome de Gitelman. Ce phénotype modéré semble en accord avec la réduction d'environ 30% des courants et de l'adressage à la membrane plasmique induit par la mutation R92W. Similairement, le phénotype modéré (Bartter classique diagnostiqué à 28 ans) du patient arborant les mutations faux-sens hétérozygotes R351P et L439P semble en accord avec le génotype car ces mutations induisent respectivement une conservation des courants de 30% et une absence de courant.

Dans le cas de la mutation du V170M, les deux altérations fonctionnelles opposées semblent en accord avec le phénotype modéré des patients homozygotes. En effet, la réduction d'expression à la membrane plasmique tend à diminuer les courants chlorures disponibles, alors que les modifications de sensibilité au pH et au calcium extracellulaires augmentent, dans des conditions physiologiques, les courants chlorures portés par ce nombre réduit de canaux.

C'est aussi le cas de certaines présentations cliniques sévères. Les mutations homozygotes L81P, G246R et G424E induisent une diminution des courants de 70 à 100%. Or, les trois patients porteurs de ces mutations montrent un phénotype sévère avec un diagnostic avant l'âge de 1 an. Nous pouvons noter que le patient présentant la mutation G246R montre une histoire de consanguinité familiale. L'ensemble de ces données démontre donc qu'il existe des corrélations positives entre le niveau de courant mesuré dans des systèmes d'expression hétérologue et la sévérité de la maladie.

Cependant, c'est loin d'être toujours le cas. En effet, la mutation homozygote R438H induit une absence de courant et est pourtant associée à un phénotype modéré. Une équipe



a précédemment rapporté la mutation R438H à l'état homozygote chez douze individus d'une même famille, tous ne présentant aucuns traits cliniques ou biochimiques clairs permettant de les diagnostiquer comme atteints d'un syndrome de Bartter classique ou d'un syndrome de Gitelman (mixte Bartter-Gitelman) (Zelikovic et al. 2003). Plus généralement, il apparaît que le phénotype des patients peut être variable au sein d'une même famille portant la même mutation homozygote (Simon et al. 1997 ; Jeck et al. 2000 ; Zelikovic et al. 2003). Ceci suggère que, d'une part, il doit exister des compensations au niveau de la branche large ascendante de l'anse de Henle permettant de réabsorber le chlorure (Ludwig et al. 2005) via le canal chlorure CLC-KA, un cotransporteur potassium-chlorure (Konrad et al. 2000) ou d'autres canaux chlorure (Marvão et al. 1998). D'autre part, ceci met en lumière notre manque de connaissances quant aux régulations physiologiques du canal CLC-KB.

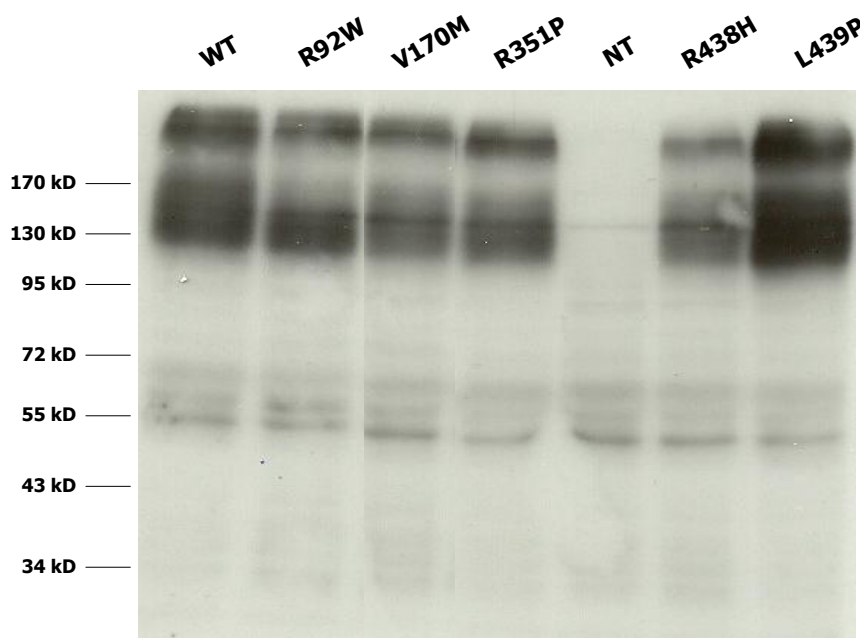
La corrélation phénotype-génotype, telle qu'elle est envisagée actuellement, exclut une question fondamentale : celle de l'interaction du CLC-KB avec son homologue le CLC-KA. Il est connu que la distribution, le long du néphron, des deux canaux n'est pas la même et en cela l'un ne peut remplacer l'autre. Cependant, ils coexistent au moins dans la branche large ascendante de l'anse Henle et les cellules intercalaires  $\alpha$  du canal collecteur (Teulon et al. 2005 ; données non publiées), et peut-être également dans les cellules terminales du tubule contourné distal (Nissant et al. 2004). Il serait donc important de vérifier si ces canaux peuvent former des hétéromères et, si cela est vrai, si nous pouvons rencontrer des mutations agissant sur la porte commune, c'est-à-dire affectant à la fois un canal CLC-KB muté et un canal CLC-KA sauvage.

### **Problèmes rencontrés dans ces études :**

Pour aller plus loin dans ces études, il aurait fallu s'assurer que les mutants non adressés à la membrane plasmique sont correctement synthétisés et que ceux partiellement adressés présentent ou non un défaut de stabilité protéique.

Pour cela, nous avons réalisé des western-blot sur des extraits protéiques totaux d'ovocytes de xénope et de cellules HEK293T. Ces analyses ont démontré que les protéines CLC-KB sauvages et mutantes forment des agrégats résistant à la dénaturation que nous n'avons malheureusement pu dissocier en utilisant divers protocoles expérimentaux au cours de ces trois années [voir Figure 25]. Ces agrégats empêchent alors de discerner la

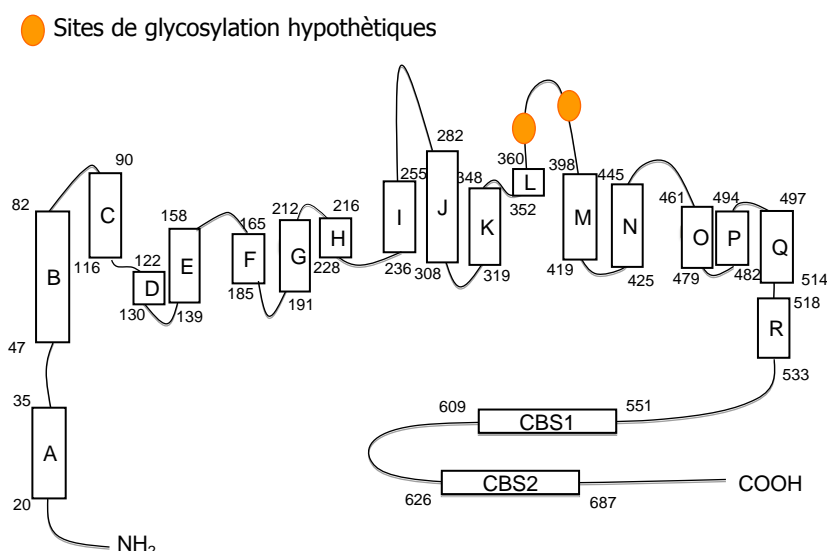
bande correspondant au monomère CLC-KB dont le poids estimé est d'environ 80kD. Malgré que ce résultat ne soit pas exploitable, il semble en accord avec les observations d'autres études qui montrent également des agrégats résistant à la dénaturation (Waldegger et al. 2000 ; Waldegger et al. 2002 ; Cappola et al. 2011). Cependant, même si, du fait des agrégats, nous ne pouvons comparer l'intensité des bandes correspondant au monomère entre les protéines sauvages et mutantes, nous observons que tous les mutants analysés, sans exception, présentent ces agrégats [voir Figure 25]. Il semble donc que tous les mutants, même ceux qui ne sont pas adressés à la membrane plasmique (R438H et L439P), soient synthétisés et ne soient pas dégradés après 48h de transfection transitoire.



**Figure 25 :** western-blot réalisé à partir d'extraits protéiques totaux des CLC-KB WT, R92W, V170M, R351P, R438H et L439P transfectés dans des cellules HEK293T. Le puit NT correspond aux extraits protéiques de cellules non-transfectées, c'est-à-dire au contrôle négatif.

Nous pouvons imaginer que les mutants non adressés à la membrane plasmique soient bloqués au sein du réticulum endoplasmique ou du Golgi. Pour le vérifier, nous pourrions digérer les protéines sauvages et mutantes avec les enzymes Endo H et PNGase F. L'enzyme Endo H retire de la protéine les résidus glycosylés riches en mannoses, spécifiques du réticulum endoplasmique, tandis que l'enzyme PNGase F coupe tous les sucres situés sur la protéine sans distinction de complexité, elle permet donc d'observer la protéine à l'état non glycosylé. Nous avons tout d'abord vérifié que le CLC-KB sauvage possédait des sites de glycosylation hypothétiques [voir Figure 26]. Nous avons ensuite digéré les protéines

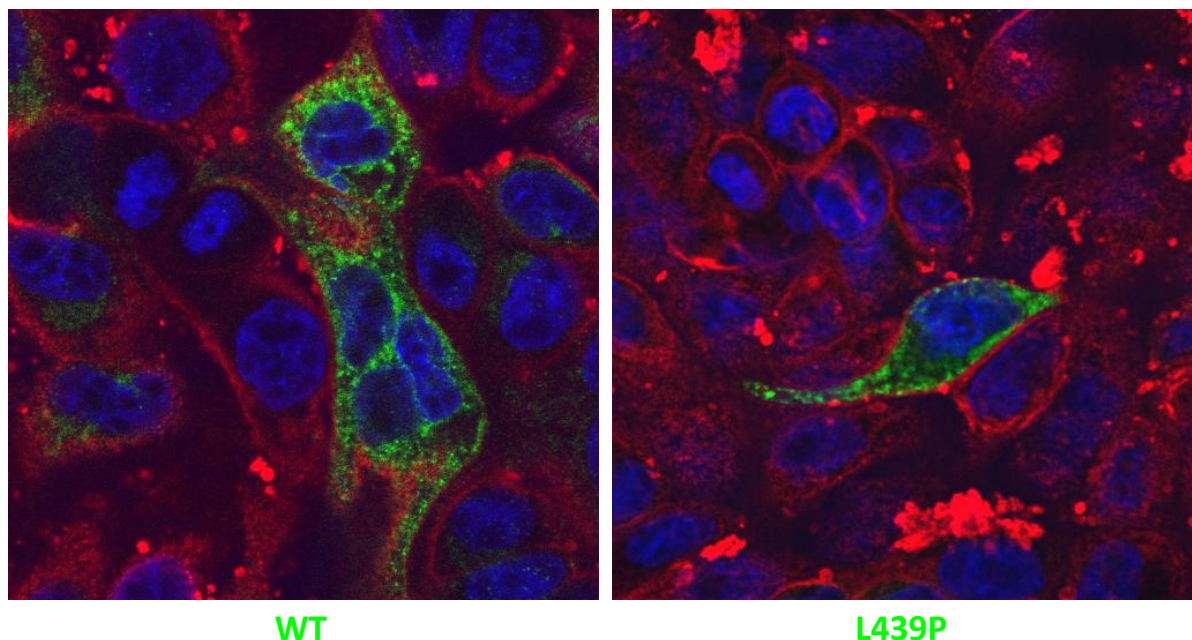
sauvages et mutantes avec les enzymes Endo H et PNGase F. Malheureusement, de la même façon que nous n'avons pu comparer l'intensité des bandes correspondant au monomère entre les protéines sauvages et mutantes, nous n'avons pu observer les bandes digérées du fait de la formation d'agréats résistant à la dénaturation.



**Figure 26 :** sites de glycosylation hypothétiques du CLC-KB localisés sur le monomère.

Nous avons alors recherché si les mutants non adressés à la membrane plasmique étaient bloqués au sein du réticulum endoplasmique ou du Golgi, en réalisant des co-immunomarquages avec un anticorps anti-FLAG, révélant le CLC-KB, et un marqueur du réticulum endoplasmique, la calnexine, ou un marqueur du Golgi, Rab6. Nous avons réalisé ces co-immunomarquages à l'aide de la lignée cellulaire rénale canine MDCK qui est un modèle établi pour l'étude du trafic épithélial. Cependant, nous nous sommes heurtés à un problème similaire à celui rencontré lors des enregistrements en cellule entière sur les HEK293. En effet, l'expression hétérologue du CLC-KB étant difficile comparée à celle du CLC-KA, il est hardue d'enregistrer le CLC-KB en patch-clamp en cellule entière et impossible de l'enregistrer en canal unitaire (Gradogna et al. 2010 ; données non publiées du laboratoire). La difficulté d'expression est la même dans les MDCK. En effet, lorsqu'on colocalise le CLC-KB sauvage (anticorps anti-FLAG) avec la biotine qui marque la membrane plasmique, il est très difficile d'observer la présence du canal sauvage à la membrane plasmique [voir Figure 27(WT)]. Ainsi, la différence de localisation entre le CLC-KB sauvage et un mutant non

adressé à la membrane plasmique (L439P) est trop subtile pour être visible sur des clichés réalisés au microscope confocal [voir Figure 27].



**Figure 27:** cellules MDCK électroporées avec le complexe CLC-KB sauvage/Barttine (**WT**) ou le complexe CLC-KB muté L439P/Barttine (**L439P**) présentant un triple marquage dapi (bleu), biotine (rouge) et FLAG (vert).

Enfin, nous pouvons imaginer que les mutants partiellement adressés à la membrane plasmique présentent un défaut de stabilité protéique. Nous pourrions le vérifier grâce à la technique de pulse-chase. Cependant, nous n'avons pas tenté de réaliser cette technique car nous nous serions très probablement heurtés au problème de la formation d'agrégats résistant à la dénaturation.

## Perspectives :

Nous avons pu observer que les régulations des CLC-K étaient très peu connues et se résument essentiellement à une activation par une augmentation du pH et de la concentration en calcium extracellulaires. De plus, il est probable que ces régulations par le pH et le calcium externes ne soient pas des régulations pertinentes physiologiquement. D'autres régulations, qui n'ont pas encore été identifiées, pourraient être plus importantes. Ainsi tous les autres CLC sont sensibles au chlorure et au pH intracellulaires (Pusch 2004), le sCLC-K2 semble inhibé par la PKC (Lourdel et al. 2003), le complexe CLC-KA/Barttine serait inhibé par l'ubiquitine ligase Ned4-2 et activé par les kinases SGK1 et SGK3 (Embark et al. 2004), le promoteur de rCLC-K2 présente deux éléments de réponse à l'AMPc et un élément

de réponse aux glucocorticoïdes (Rai et al. 1999) et enfin la séquence du CLC-KB montre un motif consensus pour les kinases SPAK et OSR1. Ces articles sont des pistes d'étude qui, associées à la recherche de mutations pathogènes et l'élaboration de mutations artificielles, permettront d'élargir nos connaissances quant aux régulations physiologiques des canaux CLC-K.

Au cours de ce travail, nous avons analysé les conséquences fonctionnelles et cliniques de seize mutations pathogènes du canal CLC-KB. Parmi ces mutations, dix d'entre elles sont présentes à l'état hétérozygote composite (V170M/G433E, A204T/G424R, S218N/G345S, S232P/C626Y et R351P/L439P). Pour se rapprocher au plus près du génotype de ces patients, il nous faudra étudier la combinaison des mutations. Nous avons déjà initié cette exploration avec les mutations V170M et G433E. Nos résultats semblent indiquer qu'aucune interaction ne se produise entre ces deux types de canaux mutés. Cependant, il est important de vérifier si les autres canaux mutés peuvent former des hétéromères. Ainsi, nous pourrions rechercher des mutations avec un effet dominant, un trait qui n'a encore jamais été décrit pour le canal CLC-KB.

Au travers ce manuscrit, nous avons observé que les patients atteints d'un syndrome de Bartter de type III présentaient une large hétérogénéité phénotypique, ainsi qu'une hypokaliémie, une hypochlorémie et une alcalose plus prononcée. Or, il existe des modèles de souris KO pour tous les membres de la famille CLC, sauf le CLC-K2. J'ai donc initié la construction d'un vecteur LoxP-*CLCNK2*-LoxP qui permettra d'inhiber spécifiquement le canal chlorure murin CLC-K2 au sein des différentes portions du néphron. Ce travail est en cours de réalisation. Par la suite, nous pourrions ainsi mieux comprendre les particularités du syndrome de Bartter de type III en croisant les souris LoxP-*CLCNK2*-LoxP aux souris exprimant la Cre recombinase uniquement au niveau de la branche large ascendante de l'anse de Henle, la Cre étant sous le contrôle du promoteur de la Tamm-Horsfall spécifique de cette branche (Stricklett et al. 2003), ou aux souris exprimant la Cre recombinase uniquement au niveau des cellules intercalaires du canal collecteur, la Cre étant sous le contrôle du promoteur *ATP6V1B1* qui code la sous-unité B1 de l'ATPase vacuolaire spécifique des cellules intercalaires du canal collecteur (Miller et al. 2009). Ces souris permettront également de peut être mieux comprendre pourquoi deux isoformes, si proches en terme de séquence, sont exprimés au sein du même organe et de confronter notre hypothèse d'un rôle des CLC-K au niveau de la macula densa

Finalement, notons que l'homologue des CLC-K humains a été cloné chez le *Xenopus laevis* et le tilapia du Mozambique *Oreochromis mossambicus* (Maulet et al. 1999 ; Vize 2003 ; Miyazaki et al. 2002). Le rein de cet amphibien et de ce téléostéen d'eau douce régule les fluides corporels et équilibre la teneur en sel dans un environnement aquatique, il excrète donc une urine diluée. De façon opposée, le rein des mammifères est adapté à la vie terrestre réabsorbant activement l'eau pour éviter la déshydratation. Ainsi, les découvertes qui pourraient être faites au sujet des CLC-K chez le *Xenopus laevis* et l'*Oreochromis mossambicus*, comportant des reins primitifs, à un niveau moléculaire seraient facilement étendues au rein des vertébrés, plus évolué. De plus, ces recherches permettraient d'augmenter nos connaissances concernant les différences apparues chez les CLC-K pour s'adapter à un environnement exclusivement terrestre.

## CONCLUSION

Les mutations d'un canal peuvent avoir différentes conséquences fonctionnelles. En effet, elles peuvent affecter la synthèse, l'adressage, la conduction ou encore la régulation de la protéine. Malgré qu'elles puissent nous permettre d'avancer sur la connaissance des mécanismes menant aux syndromes de Bartter de type III et Gitelman et les thérapies envisageables, les mutations touchant le gène codant pour le canal chlorure CLC-KB ont été très peu étudiées. C'est dans ce contexte que nous avons analysé les conséquences de mutations sur les propriétés de ce canal.

Un résultat remarquable de notre étude est que toutes les mutations étudiées altèrent l'expression membranaire de la protéine et que la conductance résiduelle est proportionnée à cette expression. Ceci signifie, qu'en première approximation, la réduction des courants provient d'une réduction du nombre de canaux et non d'une altération majeure de la conduction ou de la régulation. Ce résultat demande à être vérifié par des enregistrements en canal unitaire. Cependant, d'après la littérature et notre expérience, il est pour le moment très difficile d'enregistrer le CLC-KB en cellule entière et impossible de l'enregistrer en canal unitaire. Dans le cadre des canalopathies, on observe généralement une plus large palette de conséquences fonctionnelles. Par exemple, dans les études de mutations du canal potassique ROMK, à l'origine d'un syndrome de Bartter de type II, il a été observé des défauts de régulation et de conduction outre les défauts d'expression membranaire (Peters et al. 2003). C'est aussi le cas dans le cadre de mutations du canal CLC-1 à l'origine de myotonies. Le classement des mutations CFTR montre également l'hétérogénéité qui peut exister quant aux conséquences fonctionnelles de ces mutations : absence de synthèse protéique, altération du trafic intracellulaire, instabilité protéique et défaut de régulation ou d'activation par des agonistes physiologiques (Gelman et al. 2002). Cependant, malgré le grand nombre de mutations répertoriées du canal CFTR (1 200), la très large majorité des patients (>90%) porte la mutation  $\Delta F508$  qui entraîne à la fois une altération du trafic intracellulaire, une instabilité protéique et un défaut de régulation/activation (Gelman et al. 2002). En revanche, la majorité des mutations de NKCC2 (à l'origine d'un syndrome de Bartter de type I) ou NCC (à l'origine d'un syndrome de

Gitelman), deux co-transporteurs, ont pour conséquence un défaut d'expression à la membrane.

Un autre résultat important de notre étude est que certaines mutations modifient la sensibilité au pH et au calcium extracellulaires du CLC-KB. C'est la première fois qu'un tel fait est rapporté. La régulation par le pH et le calcium extracellulaires n'a pas forcément une grande signification physiologique car le pH et le calcium plasmatiques sont étroitement régulés. En revanche, leur altération peut avoir un impact pathologique majeur. En effet, la diminution de sensibilité à ces paramètres peut signifier que les canaux mutés localisés à la membrane (en moins grand nombre que les canaux sauvages) sont néanmoins plus actifs. Cela atténuerait donc le phénotype des patients.

Un aspect essentiel pour les patients atteints des syndromes de Bartter et de Gitelman concerne la thérapeutique applicable. Or, à l'heure actuelle, on ne dispose pas de traitement médical spécifique du syndrome de Bartter mais seulement de traitements d'appoint (supplémentations en eau et en électrolytes en association avec de l'indométacine, des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, des bloqueurs du récepteur 2 de l'angiotensine, des antagonistes de l'aldostérone et de l'amiloride). Cette thérapeutique applicable devra s'adapter à chaque cas pour corriger le défaut fonctionnel suivant qu'il touche le trafic intracellulaire de la protéine, la régulation du canal et/ou la conduction des ions chlorures. La thérapeutique envisagée pour les patients porteurs d'une mutation altérant partiellement et totalement l'expression membranaire pourrait impliquer des chaperonnes pharmacologiques qui favoriseraient un adressage correct des protéines malformées (mais potentiellement suffisamment conductrices) à la membrane plasmique. Cette stratégie a déjà été utilisée avec succès *in vitro* pour la mutation  $\Delta F508$  du CFTR grâce au Miglustat (Norez et al. 2009). Mais, comme le montrent les études utilisant ce type d'approche pour corriger les défauts de trafic des différents mutants CFTR, il s'avère très difficile de trouver une molécule suffisamment spécifique pour ne pas adresser aussi à la membrane plasmique des protéines dangereuses pour la survie cellulaire. De plus, toutes ces études montrent leur limite lorsque l'on tente de les transférer à l'Homme, comme c'est le cas pour les essais cliniques de phase II menés sur l'Homme avec le Miglustat. Enfin, la thérapeutique applicable pour les mutants altérant partiellement les courants et l'adressage membranaire résiderait dans la synthèse de molécules activant à la fois la fonction de transport du CLC-KB et son trafic à la surface des cellules. Dans cette recherche d'activation



de transport des ions chlorures, on pourrait envisager une thérapie génique modifiant la sensibilité au pH et au calcium extracellulaires du CLC-KB le rendant ainsi plus actif lors de conditions physiologiques.

En conclusion, bien que beaucoup de questions concernant les CLC-K restent à résoudre (Quelle est la stoechiométrie du complexe CLC-K/barttine? Comment la barttine exerce ses différentes fonctions sur les CLC-K? Pourquoi deux protéines si proches en terme de séquence sont exprimées au sein du même organe?), les données obtenues durant ces trois années de travail de thèse ont permis de faire avancer les connaissances sur l'impact des mutations du canal chlorure CLC-KB. Cette étude fonctionnelle montre le rôle essentiel du CLC-KB, associé à la barttine, dans le maintien de la balance sodée et laisse entrevoir un espoir thérapeutique à long terme de restauration des anomalies précisément identifiées. Enfin, l'analyse de mutations est un outil extrêmement puissant pour les études structure-fonction ; cette analyse associée à la recherche de nouveaux partenaires devrait permettre de découvrir les régulations physiologiques de ce canal, pour l'heure presque inconnues.

## BIBLIOGRAPHIE

- Accardi A, Ferrera L, Pusch M. **Drastic reduction of the slow gate of human muscle chloride channel (ClC-1) by mutation C277S.** J Physiol 2001 ; 534: 745–752.
- Accardi A, Miller C. **Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of ClC Cl-channels.** Nature 2004 ; 427(6977): 803-7.
- Accardi A, Walden M, Nguitragool W, Jayaram H, Williams C, Miller C. **Separate ion pathways in a Cl-/H+ exchanger.** J Gen Physiol 2005 ; 126(6): 563-70.
- Adachi S, Uchida S, Ito H, Hata M, Hiroe M, Marumo F, Sasaki S. **Two Isoforms of a Chloride Channel Predominantly Expressed in Thick Ascending Limb of Henle's Loop and Collecting Ducts of Rat Kidney.** J Biol Chem 1994 ; 269: 17677-17683.
- Akizuki N, Uchida S, Sasaki S, Marumo F. **Impaired solute accumulation in inner medulla of Clcnk12/2 mice kidney.** Am J Physiol Renal Physiol 2001 ; 280: F79–F87.
- Barlassina C, Dal Fiume C, Lanzani C, Manunta P, Guffanti G, Ruello A, Bianchi G, Del Vecchio L, Macciardi F, Cusi D. **Common genetic variants and haplotypes in renal CLCNKA gene are associated to salt-sensitive hypertension.** Hum Mol Genet 2007 ; 16: 1630–1638.
- Bartter FC, Pronove P, Gill JR Jr, Maccardie RC. **Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis. A new syndrome.** Am J Med 1962 ; 33: 811-28.
- Bennetts B, Rychkov GY, Ng HL, Morton CJ, Stapleton D, Parker MW, Cromer BA. **Cytoplasmic ATP-sensing domains regulate gating of skeletal muscle ClC-1 chloride channels.** J Biol Chem 2005 ; 280(37): 32452-8.
- Bernier V, Morello JP, Zarruk A, Debrand N, Salahpour A, Loneragan M, Arthus MF, Laperrière A, Brouard R, Bouvier M, Bichet D. **Pharmacologic Chaperones as a Potential Treatment for X-Linked Nephrogenic Diabetes Insipidus.** J Am Soc Nephrol 2006 ; 17: 232-243.
- Bettinelli A, Borsa N, Syren M, Mattiello C, Coviello D, Edefonti A, Giani M, Travi M, Tedeschi S. **Simultaneous Mutations in the CLCNKB and SLC12A3 Genes in Two Siblings with Phenotypic Heterogeneity in Classic Bartter Syndrome.** Pediatr Res 2005 ; 58(6): 1269-1273.
- Birkenhäger R, Otto E, Schürmann MJ, Vollmer M, Ruf EM, Maier-Lutz I, Beekmann F, Fekete A, Omran H, Feldmann D, Milford DV, Jeck N, Konrad M, Landau D, Knoers NV, Antignac C, Sudbrak R, Kispert A, Hildebrandt F. **Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure.** Nat Genet 2001 ; 29(3):310-4.
- Blanz J, Schweizer M, Auberson M, Maier H, Muenscher A, Hübner CA, Jentsch TJ. **Leukoencephalopathy upon disruption of the chloride channel ClC-2.** J Neurosci 2007 ; 27(24): 6581-9.
- Bösl MR, Stein V, Hübner C, Zdebik AA, Jordt SE, Mukhopadhyay AK, Davidoff MS, Holstein AF, Jentsch TJ. **Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon ClC-2 Cl(-) channel disruption.** EMBO J 2001 ; 20(6): 1289-99.
- Brandt S, Jentsch TJ. **ClC-6 and ClC-7 are two novel broadly expressed members of the ClC chloride channel family.** FEBS Lett 1995 ; 377(1): 15-20.
- Briet M, Vargas-Poussou R, Lourdel S, Houillier P, Blanchard A. **How Bartter's and Gitelman's syndromes, and Dent's disease have provided important insights into the function of three renal chloride channels: ClC-KA/b and ClC-5.** Nephron Physiol 2006 ; 103(1): p7-13.
- Brochard K, Boyer O, Blanchard A, Loirat C, Niaudet P, Macher MA, Deschenes G, Bensman A, Decramer S, Cochat P, Morin D, Broux F, Caillez M, Guyot C, Novo R, Jeunemaître X, Vargas-

Poussou R. **Phenotype-genotype correlation in antenatal and neonatal variants of Bartter syndrome.** Nephrol Dial Transplant 2009 ; 24(5): 1455-64.

- Capasso G, Rizzo M, Garavaglia ML, Trepiccione F, Zacchia M, Mugione A, Ferrari P, Paulmichl M, Lang F, Loffing J, Carrel M, Damiano S, Wagner CA, Bianchi G, Meyer G. **Upregulation of apical sodium-chloride cotransporter and basolateral chloride channels is responsible for the maintenance of salt-sensitive hypertension.** Am J Physiol Renal Physiol 2008 ; 295(2): F556-67.
- Cappola TP, Matkovich SJ, Wang W, van Booven D, Li M, Wang X, Qu L, Sweitzer NK, Fang JC, Reilly MP, Hakonarson H, Nerbonne JM, Dorn GW 2nd. **Loss-of-function DNA sequence variant in the CLCNKA chloride channel implicates the cardio-renal axis in interindividual heart failure risk variation.** Proc Natl Acad Sci 2011 ; 108(6): 2456-61.
- Carr G, Simmons N, Sayer J. **A role for CBS domain 2 in trafficking of chloride channel CLC-5.** Biochem Biophys Res Commun 2003 ; 310(2): 600-5.
- Cederholm JM, Rychkov GY, Bagley CJ, Bretag AH. **Inter-subunit communication and fast gate integrity are important for common gating in hCLC-1.** Int J Biochem Cell Biol 2010 ; 42(7): 1182-8.
- Cleiren E, Bénichou O, Van Hul E, Gram J, Bollerslev J, Singer FR, Beaverson K, Aledo A, Whyte MP, Yoneyama T, deVernejoul MC, Van Hul W. **Albers-Schönberg disease (autosomal dominant osteopetrosis, type II) results from mutations in the CLCN7 chloride channel gene.** Hum Mol Genet 2001 ; 10(25): 2861-7.
- Colussi G, De Ferrari ME, Tedeschi S, Prandoni S, Syrén ML, Civati G. **Bartter syndrome type 3: an unusual cause of nephrolithiasis.** Nephrol Dial Transplant 2002 ; 17: 521-3.
- Dent CE, Friedman M. **Hypercalcuric Rickets Associated with Renal Tubular Damage.** Arch Dis Child 1964 ; 39: 240-9.
- Devuyst O. **Salt wasting and blood pressure.** Nat Genet 2008 ; 40(5): 495-6.
- Duan D, Winter C, Cowley S, Hume JR, Horowitz B. **Molecular identification of a volume-regulated chloride channel.** Nature 1997 ; 390(6658): 417-21.
- Duffield M, Rychkov G, Bretag A, Roberts M. **Involvement of helices at the dimer interface in CLC-1 common gating.** J Gen Physiol 2003 ; 121: 149-161.
- Dutzler R, Campbell EB, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. **X-ray structure of a CLC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity.** Nature 2002 ; 415(6869): 287-94.
- Dutzler R, Campbell EB, MacKinnon R. **Gating the selectivity filter in CLC chloride channels.** Science 2003 ; 300: 108-112.
- Dutzler R. **The CLC family of chloride channels and transporters.** Curr Opin Struct Biol 2006 ; 16(4): 439-46.
- Embark HM, Bohmer C, Palmada M, Rajamanickam J, Wyatt AW, Wallisch S, Capasso G, Waldegger P, Seyberth HW, Waldegger S, Lang F. **Regulation of CLC-KA/barttin by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum- and glucocorticoid-dependent kinases.** Kidney Int 2004 ; 66: 1918-1925.
- Estévez R, Boettger T, Stein V, Birkenhäger R, Otto E, Hildebrandt F, Jentsch TJ. **Barttin is a Cl-channel beta-subunit crucial for renal Cl- reabsorption and inner ear K+ secretion.** Nature 2001 ; 414(6863): 558-61.
- Estévez R, Pusch M, Ferrer-Costa C, Orozco M, Jentsch TJ. **Functional and structural conservation of CBS domains from CLC chloride channels.** J Physiol 2004 ; 557: 363-78.

- Fahlke C, Fischer M. **Physiology and pathophysiology of CLC-K/barttin channels.** Front Physiol 2010 ; 1: 155.
- Fahlke C, Yu HT, Beck CL, Rhodes TH, George AL Jr. **Pore-forming segments in voltage-gated chloride channels.** Nature 1997 ; 390(6659): 529-32.
- Feng L, Campbell EB, Hsiung Y, MacKinnon R. **Structure of a eukaryotic CLC transporter defines an intermediate state in the transport cycle.** Science 2010 ; 330(6004): 635-41.
- Fischer M, Janssen AG, Fahlke C. **Barttin activates CLC-K channel function by modulating gating.** J Am Soc Nephrol 2010 ; 21(8): 1281-9.
- Fisher SE, Black GC, Lloyd SE, Hatchwell E, Wrong O, Thakker RV, Craig IW. **Isolation and partial characterization of a chloride channel gene which is expressed in kidney and is a candidate for Dent's disease (an X-linked hereditary nephrolithiasis).** Hum Mol Genet 1994 ; 3(11): 2053-9.
- Friedrich T, Breiderhoff T, Jentsch TJ. **Mutational analysis demonstrates that CLC-4 and CLC-5 directly mediate plasma membrane currents.** J Biol Chem 1999 ; 274(2): 896-902.
- Gelman MS, Kopito RR. **Rescuing protein conformation: prospects for pharmacological therapy in cystic fibrosis.** J Clin Invest 2002 ; 110(11): 1591-7.
- Gitelman HJ, Graham JB, Welt LG. **A new familial disorder characterized by hypokalemia and hypomagnesemia.** Trans Assoc Am Physicians 1966 ; 79: 221-35.
- Gradogna A, Babini E, Picollo A, Pusch M. **A regulatory calcium-binding site at the subunit interface of CLC-K kidney chloride channels.** J Gen Physiol 2010 ; 136(3): 311-23.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. **Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.** J Gen Virol 1977 ; 36(1): 59-74.
- Grand T, Mordasini D, L'Hoste S, Pennaforte T, Genete M, Biyeyeme MJ, Vargas-Poussou R, Blanchard A, Teulon J, Lourdel S. **Novel CLCN5 mutations in patients with Dent's disease result in altered ion currents or impaired exchanger processing.** Kidney Int 2009 ; 76: 999-1005.
- Graves AR, Curran PK, Smith CL, Mindell JA. **The Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> antiporter CLC-7 is the primary chloride permeation pathway in lysosomes.** Nature 2008 ; 453(7196): 788-92.
- Günther W, Lüchow A, Cluzeaud F, Vandewalle A, Jentsch TJ. **CLC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells.** Proc Natl Acad Sci 1998 ; 95(14): 8075-80.
- Günther W, Piwon N, Jentsch TJ. **The CLC-5 chloride channel knock-out mouse - an animal model for Dent's disease.** Pflugers Arch 2003 ; 445(4): 456-62.
- Guyton AC, Manning RD Jr, Norman RA Jr, Montani JP, Lohmeier TE, Hall JE. **Current concepts and perspectives of renal volume regulation in relationship to hypertension.** J Hypertens Suppl 1986 ; 4(4): S49-56.
- Hanke W, Miller C. **Single chloride channels from Torpedo electroplax. Activation by protons.** J Gen Physiol 1983 ; 82(1): 25-45.
- Haug K, Warnstedt M, Alekov AK, Sander T, Ramírez A, Poser B, Maljevic S, Hebeisen S, Kubisch C, Rebstock J, Horvath S, Hallmann K, Dullinger JS, Rau B, Haverkamp F, Beyenburg S, Schulz H, Janz D, Giese B, Müller-Newen G, Propping P, Elger CE, Fahlke C, Lerche H, Heils A. **Mutations in CLCN2 encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies.** Nat Genet 2003 ; 33(4): 527-32.
- Hayama A, Rai T, Sasaki S, Uchida S. **Molecular mechanisms of Bartter syndrome caused by mutations in the BSND gene.** Histochem Cell Biol 2003 ; 119(6): 485-93.
- Hebert SC. **Bartter syndrome.** Curr Opin Nephrol Hypertens 2003 ; 12(5): 527-32.

- Hou J, Renigunta A, Yang J, Waldegger S. **Claudin-4 forms paracellular chloride channel in the kidney and requires claudin-8 for tight junction localization.** Proc Natl Acad Sci U S A 2010 ; 107(42): 18010-5.
- Ignoul S, Eggermont J. **CBS domains: structure, function, and pathology in human proteins.** Am J Physiol Cell Physiol 2005 ; 289(6): C1369-78.
- Imai M, Kokko JP. **Mechanism of sodium and chloride transport in the thin ascending limb of Henle.** J. Clin. Invest 1976 ; 58: 1054–1060.
- Janssen AG, Scholl U, Domeyer C, Nothmann D, Leinenweber A, Fahlke C. **Disease-causing dysfunctions of barttin in Bartter syndrome type IV.** J Am Soc Nephrol 2009 ; 20(1): 145-53.
- Jeck N, Konrad M, Peters M, Weber S, Bonzel KE, Seyberth HW. **Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, leading to a mixed Bartter-Gitelman phenotype.** Pediatr Res 2000 ; 48(6): 754-8.
- Jeck N, Waldegger P, Doroszewicz J, Seyberth H, Waldegger S. **A common sequence variation of the CLCNKB gene strongly activates CLC-KB chloride channel activity.** Kidney Int 2004(a) ; 65(1): 190-7.
- Jeck N, Waldegger S, Lampert A, Boehmer C, Waldegger P, Lang PA, Wissinger B, Friedrich B, Risler T, Moehle R, Lang UE, Zill P, Bondy B, Schaeffeler E, Asante-Poku S, Seyberth H, Schwab M, Lang F. **Activating mutation of the renal epithelial chloride channel CLC-KB predisposing to hypertension.** Hypertension 2004(b) ; 43(6): 1175-81.
- Jentsch TJ. **CLC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology.** Crit Rev Biochem Mol Biol 2008 ; 43(1): 3-36.
- Jentsch TJ, Günther W, Pusch M, Schwappach B. **Properties of voltage-gated chloride channels of the CLC gene family.** J Physiol 1995 ; 482: 19S-25S.
- Jentsch TJ, Steinmeyer K, Schwarz G. **Primary structure of Torpedo marmorata chloride channel isolated by expression cloning in Xenopus oocytes.** Nature 1990 ; 348(6301): 510-4.
- Jeworutzki E, López-Hernández T, Capdevila-Nortes X, Sirisi S, Bengtsson L, Montolio M, Zifarelli G, Arnedo T, Müller CS, Schulte U, Nunes V, Martínez A, Jentsch TJ, Gasull X, Pusch M, Estévez R. **GlialCAM, a protein defective in a leukodystrophy, serves as a CLC-2 Cl(-) channel auxiliary subunit.** Neuron 2012 ; 73(5):951-61.
- Kieferle S, Fong P, Bens M, Vandewalle A, Jentsch TJ. **Two highly homologous members of the CLC chloride channel family in both rat and human kidney.** Proc Natl Acad Sci 1994 ; 91(15): 6943-7.
- Kwon TH, Nielsen J, Møller HB, Fenton RA, Nielsen S, Frøkiaer J. **Aquaporins in the kidney.** Handb Exp Pharmacol 2009 ; (190): 95-132.
- Kobayashi K, Uchida S, Mizutani S, Sasaki S, Marumo F. **Intrarenal and cellular localization of CLC-K2 protein in the mouse kidney.** J Am Soc Nephrol 2001 ; 12(7): 1327-34.
- Kobayashi K, Uchida S, Okamura HO, Marumo F, Sasaki S. **Human CLC-KB gene promoter drives the EGFP expression in the specific distal nephron segments and inner ear.** J Am Soc Nephrol 2002 ; 13: 1992–1998.
- Koch MC, Steinmeyer K, Lorenz C, Ricker K, Wolf F, Otto M, Zoll B, Lehmann-Horn F, Grzeschik KH, Jentsch TJ. **The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia.** Science 1992 ; 257(5071): 797-800.
- Konrad M, Vollmer M, Lemmink HH, Van Den Heuvel LP, Jeck N, Vargas-Poussou R, Lakings A, Ruf R, Deschène G, Antignac C, Guay-Woodford L, Knoers NV, Seyberth HW, Feldmann D, Hildebrandt

- F. **Mutations in the chloride channel gene CLCNKB as a cause of classic Bartter syndrome.** J Am Soc Nephrol 2000 ; 11: 1449–1459
- Kornak U, Kasper D, Bösl MR, Kaiser E, Schweizer M, Schulz A, Friedrich W, Delling G, Jentsch TJ. **Loss of the CLC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man.** Cell 2001 ; 104(2): 205-15.
  - Kurtz TW, Al-Bander HA, Morris RC Jr. **'Salt-sensitive' essential hypertension in men. Is the sodium ion alone important?** N Engl J Med 1987; 317: 1043–1048.
  - Kurtz TW, Morris RC Jr. **Dietary chloride and bicarbonate as determinants of desoxycorticosterone hypertension.** J Hypertens Suppl 1984; 2: S371–S373.
  - Lange PF, Wartosch L, Jentsch TJ, Fuhrmann JC. **CLC-7 requires Ostm1 as a beta-subunit to support bone resorption and lysosomal function.** Nature 2006 ; 440(7081): 220-3.
  - Leisle L, Ludwig CF, Wagner FA, Jentsch TJ, Stauber T. **CLC-7 is a slowly voltage-gated 2Cl<sup>-</sup>/1H<sup>+</sup>-exchanger and requires Ostm1 for transport activity.** EMBO J 2011 ; 30(11): 2140-52.
  - Lemmink HH, van den Heuvel LP, van Dijk HA, Merckx GF, Smilde TJ, Taschner PE, Monnens LA, Hebert SC, Knoers NV. **Linkage of Gitelman syndrome to the thiazide-sensitive sodium-chloride cotransporter gene with identification of mutations in Dutch families.** Pediatr Nephrol 1996 ; 10(4): 403-7.
  - Levief F, Hübner CA, Houillier P, Morla L, El Moghrabi S, Brideau G, Hassan H, Parker MD, Kurth I, Kougioumtzes A, Sinning A, Pech V, Riemondy KA, Miller RL, Hummler E, Shull GE, Aronson PS, Doucet A, Wall SM, Chambrey R, Eladari D. **The Na<sup>+</sup>-dependent chloride-bicarbonate exchanger SLC4A8 mediates an electroneutral Na<sup>+</sup> reabsorption process in the renal cortical collecting ducts of mice.** J Clin Invest 2010 ; 120(5): 1627-35.
  - Li X, Shimada K, Showalter LA, Weinman SA. **Biophysical properties of CLC-3 differentiate it from swelling-activated chloride channels in Chinese hamster ovary-K1 cells.** J Biol Chem 2000 ; 275(46): 35994-8.
  - Li X, Wang T, Zhao Z, Weinman SA. **The CLC-3 chloride channel promotes acidification of lysosomes in CHO-K1 and Huh-7 cells.** Am J Physiol Cell Physiol 2002 ; 282(6): C1483-91.
  - Liantonio A, Accardi A, Carbonara G, Fracchiolla G, Loiodice F, Tortorella P, Traverso S, Guida P, Pierno S, De Luca A, Conte Camerino D, Pusch M. **Molecular Requisites for Drug Binding to Muscle CLC-1 and Renal CLC-K Channel Revealed by the Use of Phenoxy-Alkyl Derivatives of 2-(p-Chlorophenoxy)Propionic Acid.** Mol Pharmacol 2002 ; 62: 265–271.
  - Liantonio A, Picollo A, Babini E, Carbonara G, Fracchiolla G, Loiodice F, Tortorella V, Pusch M, Conte Camerino D. **Activation and inhibition of kidney CLC-K chloride channels by fenamates.** Mol Pharmacol 2006 ; 69: 165–173.
  - Liantonio A, Pusch M, Picollo A, Guida P, De Luca A, Pierno S, Fracchiolla G, Loiodice F, Tortorella P, Conte Camerino D. **Investigations of pharmacologic properties of the renal CLCK1 chloride channel co-expressed with barttin by the use of 2-(p-Chlorophenoxy)propionic acid derivatives and other structurally unrelated chloride channels blockers.** J Am Soc Nephrol 2004 ; 15: 13–20.
  - Lin CM, Tsai JD, Lo YF, Yan MT, Yang SS, Lin SH. **Chronic renal failure in a boy with classic Bartter's syndrome due to a novel mutation in CLCNKB coding for the chloride channel.** Eur J Pediatr 2009 ; 168(9): 1129-33.
  - Lin YW, Lin CW, Chen TY. **Elimination of the slow gating of CLC-0 chloride channel by a point mutation.** J Gen Physiol 1999 ; 114: 1–12.
  - Lobet S, Dutzler R. **Ion-binding properties of the CLC chloride selectivity filter.** EMBO J 2006 ; 5(1): 24-33.



- Lorenz C, Meyer-Kleine C, Steinmeyer K, Koch MC, Jentsch TJ. **Genomic organization of the human muscle chloride channel *CLC-1* and analysis of novel mutations leading to Becker-type myotonia.** Hum Mol Genet 1994 ; 3: 941-946.
- Lorenz JN, Baird NR, Judd LM, Noonan WT, Andringa A, Doetschman T, Manning PA, Liu LH, Miller ML, Shull GE. **Impaired renal NaCl absorption in mice lacking the ROMK potassium channel, a model for type II Bartter's syndrome.** J Biol Chem 2002 ; 277(40): 37871-80.
- Lossin C, George AL Jr. **Myotonia congenita.** Adv Genet 2008 ; 63: 25-55.
- Lourdel S, Grand T, Burgos J, González W, Sepúlveda FV, Teulon J. **CLC-5 mutations associated with Dent's disease: a major role of the dimer interface.** Pflugers Arch 2012 ; 463: 247-256.
- Lourdel S, Paulais M, Marvao P, Nissant A, Teulon J. **A chloride channel at the basolateral membrane of the distal-convoluted tubule: a candidate CLC-K channel.** J Gen Physiol 2003 ; 121(4): 287-300.
- Lu M, Wang T, Yan Q, Yang X, Dong K, Knepper MA, Wang W, Giebisch G, Shull GE, Hebert SC. **Absence of small conductance K<sup>+</sup> channel (SK) activity in apical membranes of thick ascending limb and cortical collecting duct in ROMK (Bartter's) knockout mice.** J Biol Chem 2002 ; 277(40): 37881-7.
- Ludwig M, Doroszewicz J, Seyberth HW, Bökenkamp A, Balluch B, Nuutinen M, Utsch B, Waldegger S. **Functional evaluation of Dent's disease-causing mutations: implications for CLC-5 channel trafficking and internalization.** Hum Genet 2005 ; 117: 228-237.
- Luft FC, Zemel MB, Sowers JA, Fineberg NS, Weinberger MH. **Sodium bicarbonate and sodium chloride: effects on blood pressure and electrolyte homeostasis in normal and hypertensive man.** J Hypertens 1990; 8: 663-670.
- Maritzen T, Rickheit G, Schmitt A, Jentsch TJ. **Kidney-specific upregulation of vitamin D3 target genes in CLC-5 KO mice.** Kidney Int 2006 ; 70(1): 79-87.
- Martinez GQ, Maduke M. **A cytoplasmic domain mutation in CLC-KB affects long-distance communication across the membrane.** PLoS One 2008 ; 3(7): e2746.
- Marvão P, De Jesus Ferreira MC, Bailly C, Paulais M, Bens M, Guinamard R, Moreau R, Vandewalle A, Teulon J. **Cl<sup>-</sup> absorption across the thick ascending limb is not altered in cystic fibrosis mice. A role for a pseudo-CFTR Cl<sup>-</sup> channel.** J Clin Invest 1998 ; 102: 1986-1993.
- Matsuda JJ, Filali MS, Collins MM, Volk KA, Lamb FS. **The CLC-3 Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> antiporter becomes uncoupled at low extracellular pH.** J Biol Chem 2010 ; 285(4): 2569-79.
- Matsumura Y, Uchida S, Kondo Y, Miyazaki H, Ko S, Hayama A, Morimoto T, Liu W, Arisawa M, Sasaki S, Marumo F. **Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel.** Nat Genet 1999 ; 21(1): 95-8.
- Maulet Y, Lambert RC, Mykita S, Mouton J, Partisani M, Bailly Y, Bombarde G, Feltz A. **Expression and targeting to the plasma membrane of xCLC-K, a chloride channel specifically expressed in distinct tubule segments of Xenopus laevis kidney.** Biochem J 1999 ; 340 : 737-43.
- Meyer-Kleine C, Steinmeyer K, Ricker K, Jentsch TJ, Koch MC. **Spectrum of mutations in the major human skeletal muscle chloride channel gene (CLCN1) leading to myotonia.** Am J Hum Genet 1995 ; 57: 1325-1334.
- Miller C, White MM. **Dimeric structure of single chloride channels from Torpedo electroplax.** Proc Natl Acad Sci 1984 ; 81(9): 2772-5.

- Miller RL, Lucero OM, Riemony KA, Baumgartner BK, Brown D, Breton S, Nelson RD. ***The V-ATPase B1-subunit promoter drives expression of Cre recombinase in intercalated cells of the kidney.*** *Kidney Int* 2009 ; 75(4): 435-9.
- Milton AG, Jannes J, Hamilton-Bruce MA, Koblar SA. ***Activating mutation of the renal epithelial chloride channel CLC-KB predisposing to hypertension.*** *Hypertension* 2006 ; 47(3): e12-e13
- Miyamura N, Matsumoto K, Taguchi T, Tokunaga H, Nishikawa T, Nishida K, Toyonaga T, Sakakida M, Araki E. ***Atypical Bartter syndrome with sensorineural deafness with G47R mutation of the beta-subunit for CLC-KA and CLC-KB chloride channels, barttin.*** *J Clin Endocrinol Metab* 2003 ; 88(2): 781-6.
- Miyazaki H, Kaneko T, Uchida S, Sasaki S, Takei Y. ***Kidney-specific chloride channel, OmClC-K, predominantly expressed in the diluting segment of freshwater-adapted tilapia kidney.*** *Proc Natl Acad Sci* 2002 ; 99(24): 15782-7.
- Neagoe I, Stauber T, Fidzinski P, Bergsdorf EY, Jentsch TJ. ***The late endosomal CLC-6 mediates proton/chloride countertransport in heterologous plasma membrane expression.*** *J Biol Chem* 2010 ; 285(28): 21689-97.
- Niemeyer MI, Cid LP, Yusef YR, Briones R, Sepúlveda FV. ***Voltage-dependent and -independent titration of specific residues accounts for complex gating of a CLC chloride channel by extracellular protons.*** *J Physiol* 2009 ; 587: 1387-400.
- Niemeyer MI, Yusef YR, Cornejo I, Flores CA, Sepúlveda FV, Cid LP. ***Functional evaluation of human CLC-2 chloride channel mutations associated with idiopathic generalized epilepsies.*** *Physiol Genomics* 2004 ; 19(1): 74-83.
- Nissant A, Lourdel S, Baillet S, Paulais M, Marvao P, Teulon J, Imbert-Teboul M. ***Heterogeneous distribution of chloride channels along the distal convoluted tubule probed by single-cell RT-PCR and patch clamp.*** *Am J Physiol Renal Physiol* 2004 ; 287(6): F1233-43.
- Nissant A, Paulais M, Lachheb S, Lourdel S, Teulon J. ***Similar chloride channels in the connecting tubule and cortical collecting duct of the mouse kidney.*** *Am J Physiol Renal Physiol* 2006 ; 290(6): F1421-9.
- Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T, Takahashi H, Nakayama H, Kanaoka Y, Minamino N, et al. ***Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence.*** *Nature* 1984 ; 312(5990): 121-7.
- Norez C, Antigny F, Noel S, Vandebrouck C, Becq F. ***A cystic fibrosis respiratory epithelial cell chronically treated by miglustat acquires a non-cystic fibrosis-like phenotype.*** *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009 ; 41(2): 217-25.
- Novarino G, Weinert S, Rickheit G, Jentsch TJ. ***Endosomal chloride-proton exchange rather than chloride conductance is crucial for renal endocytosis.*** *Science* 2010 ; 328(5984): 1398-401.
- Nozu K, Fu XJ, Nakanishi K, Yoshikawa N, Kaito H, Kanda K, Krol RP, Miyashita R, Kamitsuji H, Kanda S, Hayashi Y, Satomura K, Shimizu N, Iijima K, Matsuo M. ***Molecular analysis of patients with type III Bartter syndrome: picking up large heterozygous deletions with semiquantitative PCR.*** *Pediatr Res* 2007 ; 62(3): 364-9.
- Nozu K, Inagaki T, Fu XJ, Nozu Y, Kaito H, Kanda K, Sekine T, Igarashi T, Nakanishi K, Yoshikawa N, Iijima K, Matsuo M. ***Molecular analysis of digenic inheritance in Bartter syndrome with sensorineural deafness.*** *J Med Genet* 2008 ; 45(3): 182-6.
- Pangrazio A, Pusch M, Caldana E, Frattini A, Lanino E, Tamhankar PM, Phadke S, Lopez AG, Orchard P, Mihci E, Abinun M, Wright M, Vettenranta K, Bariaie I, Melis D, Tezcan I, Baumann C, Locatelli F, Zecca M, Horwitz E, Mansour LS, Van Roij M, Vezzoni P, Villa A, Sobacchi C. ***Molecular***



**and clinical heterogeneity in CLCN7-dependent osteopetrosis: report of 20 novel mutations.** Hum Mutat 2010 ; 31: E1071-1080.

- Pearce SH. **Straightening out the renal tubule: advances in the molecular basis of the inherited tubulopathies.** QJM 1998 ; 91(1): 5-12.
- Pech V, Pham TD, Hong S, Weinstein AM, Spencer KB, Duke BJ, Walp E, Kim YH, Sutliff RL, Bao HF, Eaton DC, Wall SM. **Pendrin modulates ENaC function by changing luminal HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>.** J Am Soc Nephrol 2010 ; 21(11): 1928-41.
- Peters M, Ermert S, Jeck N, Derst C, Pechmann U, Weber S, Schlingmann KP, Seyberth HW, Waldegger S, Konrad M. **Classification and rescue of ROMK mutations underlying hyperprostaglandin E syndrome/antenatal Bartter syndrome.** Kidney Int 2003 ; 64:923-932.
- Peters TA, Monnens LA, Cremers CW, Curfs JH. **Genetic disorders of transporters/channels in the inner ear and their relation to the kidney.** Pediatr Nephrol 2004 ; 19(11): 1194-201.
- Picollo A, Liantonio A, Babini E, Camerino DC, Pusch M. **Mechanism of interaction of niflumic acid with heterologously expressed kidney CLC-K chloride channels.** J Membr Biol, 2007 ; 216: 73-82.
- Picollo A, Liantonio A, Didonna MP, Elia L, Camerino DC, Pusch M. **Molecular determinants of differential pore blocking of kidney CLC-K chloride channels.** EMBO Rep 2004 ; 5: 584-589.
- Picollo A, Pusch M. **Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins CLC-4 and CLC-5.** Nature 2005 ; 436(7049): 420-3.
- Piwon N, Günther W, Schwake M, Bösl MR, Jentsch TJ. **CLC-5 Cl<sup>-</sup>-channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease.** Nature 2000 ; 408(6810): 369-73.
- Poët M, Kornak U, Schweizer M, Zdebik AA, Scheel O, Hoelter S, Wurst W, Schmitt A, Fuhrmann JC, Planells-Cases R, Mole SE, Hübner CA, Jentsch TJ. **Lysosomal storage disease upon disruption of the neuronal chloride transport protein CLC-6.** Proc Natl Acad Sci 2006 ; 103(37): 13854-9.
- Pusch M. **Knocking on channel's door. The permeating chloride ion acts as the gating charge in CLC-0.** J Gen Physiol 1996 ; 108(4): 233-6.
- Pusch M. **Structural insights into chloride and proton-mediated gating of CLC chloride channels.** Biochemistry 2004 ; 43(5): 1135-44.
- Pusch, M, Steinmeyer K, Jentsch, T.J. **Low single channel conductance of the major skeletal muscle chloride channel, CLC-1.** Biophys J 1994 ; 66: 149-152.
- Pusch M, Steinmeyer K, Koch MC, Jentsch TJ. **Mutations in dominant human myotonia congenita drastically alter the voltage dependence of the CLC-1 chloride channel.** Neuron 1995 ; 15: 1455-1463.
- Qu C, Liang F, Hu W, Shen Z, Spicer SS, Schulte BA. **Expression of CLC-K chloride channels in the rat cochlea.** Hear Res 2006 ; 213(1-2): 79-87.
- Rai T, Uchida S, Sasaki S, Marumo F. **Isolation and characterization of kidney-specific CLC-K2 chloride channel gene promoter.** Biochem Biophys Res Commun 1999 ; 261(2): 432-8.
- Riazuddin S, Anwar S, Fischer M, Ahmed ZM, Khan SY, Janssen AG, Zafar AU, Scholl U, Husnain T, Belyantseva IA, Friedman PL, Riazuddin S, Friedman TB, Fahlke C. **Molecular basis of DFNB73: mutations of BSND can cause nonsyndromic deafness or Bartter syndrome.** Am J Hum Genet 2009 ; 85(2): 273-80.
- Richard EA, Miller C. **Steady-state coupling of ion-channel conformations to a transmembrane ion gradient.** Science 1990 ; 247(4947): 1208-10.

- Rickheit G, Maier H, Strenzke N, Andreescu CE, De Zeeuw CI, Muenscher A, Zdebik AA, Jentsch TJ. ***Endocochlear potential depends on Cl<sup>-</sup> channels: mechanism underlying deafness in Bartter syndrome IV.*** EMBO J 2008 ; 27(21): 2907-17.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC. ***Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA.*** Science 1989 ; 245(4922): 1066-73.
- Robertson JL, Kolmakova-Partensky L, Miller C. ***Design, function and structure of a monomeric ClC transporter.*** Nature 2010 ; 468: 844-847.
- Rossier BC, Schild L. ***Epithelial sodium channel: mendelian versus essential hypertension.*** Hypertension 2008 ; 52(4): 595-600.
- Rychkov GY, Pusch M, Astill DS, Roberts ML, Jentsch TJ, Bretag AH. ***Concentration and pH dependence of skeletal muscle chloride channel ClC-1.*** J Physiol 1996 ; 497: 423-35.
- Sage CL, Marcus DC. ***Immunolocalization of ClC-K chloride channel in strial marginal cells and vestibular dark cells.*** Hear Res 2001 ; 160(1-2): 1-9.
- Sakamoto H, Sado Y, Naito I, Kwon TH, Inoue S, Endo K, Kawasaki M, Uchida S, Nielsen S, Sasaki S, Marumo F. ***Cellular and subcellular immunolocalization of ClC-5 channel in mouse kidney: colocalization with H<sup>+</sup>-ATPase.*** Am J Physiol 1999 ; 277: F957-65.
- Scheel O, Zdebik AA, Lourdel S, Jentsch TJ. ***Voltage-dependent electrogenic chloride/proton exchange by endosomal ClC proteins.*** Nature 2005 ; 436(7049): 424-7.
- Schlingmann KP, Konrad M, Jeck N, Waldegger P, Reinalter SC, Holder M, Seyberth HW, Waldegger S. 2004. ***Salt wasting and deafness resulting from mutations in two chloride channels.*** N Engl J Med 2004 ; 350: 1314–1319.
- Scholl U, Hebeisen S, Janssen AG, Müller-Newen G, Alekov A, Fahlke C. ***Barttin modulates trafficking and function of ClC-K channels.*** Proc Natl Acad Sci 2006 ; 103(30): 11411-6.
- Schorr U, Distler A, Sharma AM. Effect of sodium chloride- and sodium bicarbonate-rich mineral water on blood pressure and metabolic parameters in elderly normotensive individuals: a randomized double-blind crossover trial. J Hypertens 1996 ; 14: 131–135.
- Scott JW, Hawley SA, Green KA, Anis M, Stewart G, Scullion GA, Norman DG, Hardie DG. ***CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations.*** J Clin Invest. 2004 ; 113(2): 274-84.
- Sile S, Velez DR, Gillani NB, Narsia T, Moore JH, George AL Jr, Vanoye CG, Williams SM. ***CLCNKB-T481S and essential hypertension in a Ghanaian population.*** J Hypertens 2009 ; 27(2): 298-304.
- Simon DB, Bindra RS, Mansfield TA, Nelson-Williams C, Mendonca E, Stone R, Schurman S, Nayir A, Alpay H, Bakkaloglu A, Rodriguez-Soriano J, Morales JM, Sanjad SA, Taylor CM, Pilz D, Brem A, Trachtman H, Griswold W, Richard GA, John E, Lifton RP. ***Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III.*** Nat Genet 1997 ; 17(2): 171-8.
- Simon DB, Karet FE, Hamdan JM, DiPietro A, Sanjad SA, Lifton RP. ***Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2.*** Nat Genet 1996 ; 13(2): 183-8.
- Simon DB, Karet FE, Rodriguez-Soriano J, Hamdan JH, DiPietro A, Trachtman H, Sanjad SA, Lifton RP. ***Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K<sup>+</sup> channel, ROMK.*** Nat Genet 1996 ; 14(2): 152-6.

- Steinmeyer K, Klocke R, Ortland C, Gronemeier M, Jockusch H, Gründer S, Jentsch TJ. ***Inactivation of muscle chloride channel by transposon insertion in myotonic mice.*** Nature 1991 ; 354(6351): 304-8.
- Steinmeyer K, Schwappach B, Bens M, Vandewalle A, Jentsch TJ. ***Cloning and functional expression of rat CLC-5, a chloride channel related to kidney disease.*** J Biol Chem 1995 ; 270(52): 31172-7.
- Stobrawa SM, Breiderhoff T, Takamori S, Engel D, Schweizer M, Zdebik AA, Bösl MR, Ruether K, Jahn H, Draguhn A, Jahn R, Jentsch TJ. ***Disruption of CLC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus.*** Neuron 2001 ; 29(1): 185-96.
- Stricklett PK, Taylor D, Nelson RD, Kohan DE. ***Thick ascending limb-specific expression of Cre recombinase.*** Am J Physiol Renal Physiol 2003 ; 285(1): F33-9.
- Tajima M, Hayama A, Rai T, Sasaki S, Uchida S. ***Barttin binds to the outer lateral surface of the CLC-K2 chloride channel.*** Biochem Biophys Res Commun 2007 ; 362(4): 858-64.
- Tajima T, Nawate M, Takahashi Y, Mizoguchi Y, Sugihara S, Yoshimoto M, Murakami M, Adachi M, Tachibana K, Mochizuki H, Fujieda K. ***Molecular analysis of the CLCNKB gene in Japanese patients with classic Bartter syndrome.*** Endocr J 2006 ; 53(5): 647-52.
- Takahashi N, Chernavsky DR, Gomez RA, Igarashi P, Gitelman HJ, Smithies O. ***Uncompensated polyuria in a mouse model of Bartter's syndrome.*** Proc Natl Acad Sci 2000 ; 97(10): 5434-9.
- Tanaka M, Schmidlin O, Yi SL, Bollen AW, Morris RC Jr. ***Genetically determined chloride-sensitive hypertension and stroke.*** Proc Natl Acad Sci U S A 1997 ; 94(26): 14748-52.
- Teulon J. ***Le patch-clamp en bref.*** Médecine/Sciences 2004 ; 20(5): 550.
- Teulon J, Lourdel S, Nissant A, Paulais M, Guinamard R, Marvao P, Imbert-Teboul M. ***Exploration of the basolateral chloride channels in the renal tubule using.*** Nephron Physiol 2005 ; 99(2):p64-8.
- Teulon J, Vandewalle A. ***Fonctions physiologiques des canaux chlorure de la famille CLC.*** Médecine/Sciences 2002 ; 18: 595-604.
- Thiemann A, Gründer S, Pusch M, Jentsch TJ. ***A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells.*** Nature 1992 ; 356(6364): 57-60.
- Traverso S, Zifarelli G, Aiello R, Pusch M. ***Proton sensing of CLC-0 mutant E166D.*** J Gen Physiol 2006 ; 127:51-65.
- Uchida S, Sasaki S, Furukawa T, Hiraoka M, Imai T, Hirata Y, Marumo F. ***Molecular cloning of a chloride channel that is regulated by dehydration and expressed predominantly in kidney medulla.*** J Biol Chem 1993 ; 268(6): 3821-4.
- Uchida S, Sasaki S, Nitta K, Uchida K, Horita S, Nihei H, Marumo F. ***Localization and functional characterization of rat kidney-specific chloride channel, CLC-K1.*** J Clin Invest 1995 ; 95(1): 104-13.
- Unwin RJ, Capasso G. ***Bartter's and Gitelman's syndromes: their relationship to the actions of loop and thiazide diuretics.*** Curr Opin Pharmacol 2006 ; 6(2): 208-13.
- Urbanová M, Reiterová J, Stěkrová J, Lněnička P, Ryšavá R. ***DNA analysis of renal electrolyte transporter genes among patients suffering from Bartter and Gitelman syndromes: summary of mutation screening.*** Folia Biol (Praha) 2011 ; 57(2): 65-73.
- Van Slegtenhorst MA, Bassi MT, Borsani G, Wapenaar MC, Ferrero GB, de Conciliis L, Rugarli EI, Grillo A, Franco B, Zoghbi HY, Ballabio A. ***A gene from the Xp22.3 region shares homology with voltage-gated chloride channels.*** Hum Mol Genet. 1994 ; 3(4): 547-52.

- Vandewalle A, Cluzeaud F, Bens M, Kieferle S, Steinmeyer K, Jentsch TJ. **Localization and induction by dehydration of CLCK chloride channels in the rat kidney.** Am J Physiol 1997 ; 272: F678-F688.
- Vandewalle A, Cluzeaud F, Peng KC, Bens M, Lüchow A, Günther W, Jentsch TJ. **Tissue distribution and subcellular localization of the CLC-5 chloride channel in rat intestinal cells.** Am J Physiol Cell Physiol 2001 ; 280(2): C373-81.
- Verlander JW, Hassell KA, Royaux IE, Glapion DM, Wang ME, Everett LA, Green ED, Wall SM. **Deoxycorticosterone upregulates PDS (Slc26a4) in mouse kidney: role of pendrin in mineralocorticoid-induced hypertension.** Hypertension 2003 ; 42(3): 356-62.
- Vize PD. **The chloride conductance channel CLC-K is a specific marker for the Xenopus pronephric distal tubule and duct.** Gene Expr Patterns 2003 ; 3(3): 347-50.
- Waldegger S, Jeck N, Barth P, Peters M, Vitzthum H, Wolf K, Kurtz A, Konrad M, Seyberth HW. **Barttin increases surface expression and changes current properties of CLC-K channels.** Pflugers Arch 2002 ; 444(3): 411-8.
- Waldegger S, Jentsch TJ. **Functional and structural analysis of CLC-K chloride channels involved in renal disease.** J Biol Chem 2000 ; 275(32): 24527-33.
- Wall SM, Kim YH, Stanley L, Glapion DM, Everett LA, Green ED, Verlander JW. **NaCl restriction upregulates renal Slc26a4 through subcellular redistribution: role in Cl<sup>-</sup> conservation.** Hypertension 2004 ; 44(6): 982-7.
- Wang SS, Devuyst O, Courtoy PJ, Wang XT, Wang H, Wang Y, Thakker RV, Guggino S, Guggino WB. **Mice lacking renal chloride channel, CLC-5, are a model for Dent's disease, a nephrolithiasis disorder associated with defective receptor-mediated endocytosis.** Hum Mol Genet 2000 ; 9(20): 2937-45.
- Weinreich F, Jentsch TJ. **Pores formed by single subunits in mixed dimers of different CLC chloride channels.** J Biol Chem 2001 ; 276(4): 2347-53.
- Whitescarver SA, Ott CE, Jackson BA, Guthrie GP Jr, Kotchen TA. **Salt-sensitive hypertension: contribution of chloride.** Science 1984; 223: 1430–1432.
- Wollnik B, Kubisch C, Steinmeyer K, Pusch M. **Identification of functionally important regions of the muscular chloride channel CLC-1 by analysis of recessive and dominant myotonic mutations.** Hum Mol Genet 1997 ; 6: 805-811.
- Yu Y, Xu C, Pan X, Ren H, Wang W, Meng X, Huang F, Chen N. **Identification and functional analysis of novel mutations of the CLCNKB gene in Chinese patients with classic Bartter syndrome.** Clin Genet 2010 ; 77(2): 155-62.
- Yusef YR, Zúñiga L, Catalán M, Niemeyer MI, Cid LP, Sepúlveda FV. **Removal of gating in voltage-dependent CLC-2 chloride channel by point mutations affecting the pore and C-terminus CBS-2 domain.** J Physiol 2006 ; 572:173-181.
- Zdebik AA, Zifarelli G, Bergsdorf E-Y, Soliani P, Scheel O, Jentsch TJ, Pusch, M. **Determinants of anion-proton coupling in mammalian endosomal CLC proteins.** J Biol Chem 2008 ; 283: 4219–4227.
- Zelikovic I, Szargel R, Hawash A, Labay V, Hatib I, Cohen N, Nakhoul F. **A novel mutation in the chloride channel gene, CLCNKB, as a cause of Gitelman and Bartter syndromes.** Kidney Int 2003 ; 63(1): 24-32.
- Zhao Z, Li X, Hao J, Winston JH, Weinman SA. **The CLC-3 chloride transport protein traffics through the plasma membrane via interaction of an N-terminal dileucine cluster with clathrin.** J Biol Chem 2007 ; 282(39): 29022-31.

- Zifarelli G, Liantonio A, Gradogna A, Picollo A, Gramegna G, De Bellis M, Murgia AR, Babini E, Camerino DC, Pusch M. ***Identification of sites responsible for the potentiating effect of niflumic acid on CLC-KA kidney chloride channels.*** Br J Pharmacol 2010 ; 160(7): 1652-61.
- Zifarelli G, Pusch M. ***Intracellular regulation of human CLC-5 by adenine nucleotides.*** EMBO Rep 2009 ; 10(10):1111-6.